

# CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIGÊNICAS ISOLADAS DE ÁGUA, LEITE E FEZES DE BOVINOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO-SP

Ariel Eurides Stella<sup>1</sup>; Everlon Cid Rigobelo<sup>2</sup>; Ana Claudia de Oliveira<sup>1</sup>;  
Renato Pariz Maluta<sup>1</sup>; José Moacir Marin<sup>1</sup>; Fernando Antônio de Ávila<sup>1</sup>

1. Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp de Jaboticabal.

2. Departamento de Zootecnia da Unidade Experimental Unesp de Dracena.

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES

## RESUMO

A *Escherichia coli*, usualmente, permanece sem causar dano, confinada ao lúmen intestinal, entretanto em indivíduos debilitados ou imunossuprimidos, ou ainda quando as barreiras imunes do trato gastrointestinal são violadas, mesmo as espécies não patogênicas podem causar infecções. A lesão característica das infecções causadas pelas EPEC é chamada de “attaching and effacing”. Objetivou-se nesse trabalho caracterizar os principais fatores de virulência (Stx 1, Stx 2, BFP, EAF, EAE, LT-II e hemólise) de 473 cepas de *E. coli* isoladas de 19 amostras de água, sete amostras de leite de conjunto e 466 amostras de fezes de bovinos leiteiros de sete propriedades, da região de Ribeirão Preto-SP, através da detecção da presença dos genes pela técnica de PCR.. Todas as cepas de *E. coli* foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro para sorogrupos EPEC. A caracterização epidemiológica foi feita utilizando a técnica de ERIC-PCR e foi realizada com 153 estirpes de diferentes perfis de virulência. Observou-se um coeficiente de prevalência maior entre bezerros tanto para *stx1*(13,5%) como para *stx2* (9,0%) quando comparado as vacas (*stx1*: 10,3% e *stx2*: 6,2% ). Com relação a seqüência *eae* a prevalência entre os bezerros (9,7%) foi bem maior que a das vacas (1,6%). Para LT-II a prevalência entre os animais jovens também foi maior (10,3% contra 4,5%). Nenhum crescimento obtido de amostras de água apresentou seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II*. Entretanto, três amostras de leite (43%) foram

positivas para o gene *stx1*, uma (14,3%) para o gene *stx2* e outra (14,3%) para o gene LT-II. Os dois sorotipos O157:H7 isolados apresentaram ambos os genes *stx1* e *eae* e são potenciais estirpes enterohemorrágicas. As seqüências de genes *stx1* de *E. coli* foram as que apresentaram maior prevalência nas fezes dos bovinos. Os bezerros apresentaram uma maior prevalência para todos os genes pesquisados. Seqüências de genes *stx1*, *stx2* e LT-II foram identificadas em estirpes isoladas do leite. As estirpes isoladas de água, leite e fezes apresentaram alta similaridade genética. As fezes bovinas representam uma importante fonte de contaminação ambiental para *E. coli* shigatoxigênica e enterotoxigênica.

Palavras chave: *Escherichia coli*, O157:H7, STEC.

### **Introdução**

A morbidade e mortalidade associadas aos vários surtos de doenças gastrointestinais causados por STEC têm alertado sobre a importância desses microrganismos à saúde pública (Paton and Paton, 1998). Estirpes produtoras de toxina Shiga, foram envolvidas em infecções causadas pelo consumo de produtos lácteos, como queijo (Deschênes et al., 1996) e leite cru (Wilson et al., 1996). Tristão et al. (2007) sugerem que bovinos sadios podem ser potenciais fontes de infecção, por STEC, para humanos no Brasil. Salvadori et al. (2003) relatam que os bovinos jovens no Brasil, podem ser, uma importante fonte de *E. coli* patogênica a outros animais e ao homem.

Relatos indicam a associação entre o consumo de leite não pasteurizado e a colite hemorrágica (CH) ou a síndrome urêmica hemolítica (SUH) (Kirk et al, 1997). A *E. coli* produtora de toxina shiga foi também isolada de leite cru, filtros de leite e produtos lácteos como iogurte e queijos (Hussein e Sakuma, 2005). Bovinos, particularmente bovinos leiteiros são um importante reservatório de STEC (Wilson et al., 1996). Além disso, o ambiente contaminado de fazendas leiteiras pode persistir como fonte de infecção por STEC por vários meses (Hussein and Sakuma, 2005).

ETEC, são a maior causa da diarreia dos viajantes em regiões subtropicais, bem como nos animais. Estirpes ETEC podem causar diarreia através da produção de toxina LT, ST ou ambas.

### **Materiais e Métodos**

As 473 cepas de *E. coli* utilizadas neste projeto foram isoladas de amostras de água (19), leite (7) e fezes (466) de sete propriedades da região de Ribeirão Preto-SP. Essas cepas foram obtidas através de semeadura dos espécimes em agar MacConkey e agar MacConkey Sorbitol. As colônias crescidas nestes meios, após incubação por 24-48 horas a temperatura de 37° C, foram identificadas bioquimicamente como pertencentes a espécie. Todas as estirpes de *E. coli* foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro para sorogrupos EPEC da Probac (Probac do Brasil, SP, Brasil ) segundo as instruções do fabricante. As amostras que se mostraram sorbitol negativo no meio agar MacConkey sorbitol foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro específico O157 (Probac). As amostras positivas

neste teste foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP para confirmação do sorogrupo e determinação do antígeno flagelar H7.

O DNA microbiano foi extraído a partir de uma colônia isolada de *E. coli* semeada por 12 horas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio Brain Heart Infusion, depois transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 15.000 rpm para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 250µL de água Millique estéril e agitada em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e repetido o processo de lavagem. Após duas lavagens com água Milique, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos na água fervente (100° C). Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos, do tubo foi retirado uma alíquota de 150µL do sobrenadante fervido e transferida para outro tubo eppendorf. Em seguida esse material foi estocado em freezer a -20° C até o momento de uso.

As estirpes de *Escherichia coli* foram submetidas à PCR; os genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram detectados usando primers e condições descritas por Paton and Paton (1998). A presença do gene LT II foi investigada utilizando primers e condições relatadas por Penteadó et al. (2002). Esses oligonucleotídeos foram adquiridos da Isogen Bioscience. O produto da reação amplificado foi visualizado em gel de eletroforese contendo 10 uL do produto de PCR e 1,5% de gel de agarose. Foi utilizado o marcador molecular ? X-174 Hae III digest.

A expressão de enterohemolisina foi determinada de acordo com Beutin et al (1997). As placas foram encubadas a 37°C por 24 horas, a verificação da hemólise foi realizada depois de 3 e 24 horas.

### Resultados e Discussão

No presente estudo uma prevalência de 11,4% para o gene *stx1*, 7,1% para *stx2* e 4,3% para *eae* foi encontrada nas fezes de bovinos pertencentes a rebanhos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP (Tab. 1). A prevalência de STEC tem sido descrita em vários países, sendo que alguns autores relatam frequências maiores e outros menores que as obtidas neste trabalho. No Brasil Cerqueira et al. (1999) relatam uma grande prevalência (71%) de STEC isoladas de amostras de fezes de bovinos saudáveis, onde a prevalência em bovinos leiteiros foi maior que a de bovinos de corte, 82% e 53% respectivamente; entre as estirpes positivas prevaleceu as seqüências *stx1/stx2* em bovinos leiteiros (69%) e a seqüência *stx1* foi a mais freqüente entre os bovinos de corte; Tristão et al. (2007) identificaram cepas STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28% no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis no Brasil podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Tabela 1. Número e porcentagem de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram no crescimento bacteriano de amostras de fezes seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* ou LT-II de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia de polimerase. Jaboticabal/SP, 2007.

Seqüências	Positivos	Negativos	Total	CP* (%)
<i>stx1</i>	53	414	466	11,4
<i>stx2</i>	33	433	466	7,1
<i>Eae</i>	20	446	466	4,3
LT-II	30	436	466	6,4

CP\*-Coeficiente de Prevalência

Observa-se na tabela 2 a prevalência dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, entre as faixas etárias o coeficiente foi maior entre os animais jovens (bezerros).

Nenhum crescimento obtido de amostras de água apresentou seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II*. Entretanto três amostras de leite foram positivas para o gene *stx1*, uma para o gene *stx2* e outra para o gene *LT-II*.

Os dois sorotipos O157:H7 isolados neste trabalho apresentaram ambos os genes *stx1* e *eae*; em um dos isolados também se verificou hemólise, portanto as estirpes são potenciais enterohemorrágicas. Cerqueira et al.(1999) relatam o isolamento de três estirpes O157:H7 de rebanhos bovinos no Brasil, sendo que duas possuíam os genes *stx2* e uma ambos *stx1/stx2*. Irino et al. (2005) também no Brasil isolaram duas estirpes O157:H7 entretanto nenhuma portava o gene *stx1* ou *stx2*, portando somente o gene *eae*.

Tabela 2. Número e porcentagem de bovinos da região de Ribeirão Preto que apresentaram no crescimento bacteriano de amostras de fezes seqüências *stx1*, *stx2*, *eae* ou *LT-II* de *Escherichia coli*, detectadas por reação em cadeia de polimerase, de acordo com a faixa etária dos animais. Jaboticabal/SP, 2007.

Faixa Etária	Seqüências	Positivos	Negativos	Total	CP* (%)
Bezerros	<i>stx1</i>	21	134	155	13,5
	<i>stx2</i>	14	141	155	9,0
	<i>eae</i>	15	140	155	9,7
	<i>LT-II</i>	16	139	155	10,3
Vacas	<i>stx1</i>	32	279	311	10,3
	<i>stx2</i>	19	292	311	6,2
	<i>eae</i>	5	306	311	1,6
	<i>LT-II</i>	14	297	311	4,5

CP\*-Coeficiente de Prevalência

No presente estudo uma prevalência de 6,4% para o gene *LT-II* foi encontrada nas fezes de bovinos sadios pertencentes a rebanhos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP (Tabela 1). A prevalência entre os animais jovens também foi maior, 10,3% contra 4,5% das vacas. Salvadori *et al.* (2003) encontrou 8.3% de genes *LT-II* em isolados de *E. coli* de bezerros com diarreia no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Das diferentes causas de diarreia em bezerros, a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é a mais comum.

## Conclusões

Esforços para implementar práticas, na agroindústria, que venham a reduzir a contaminação cruzada entre alimentos de diferente origens são fundamentais para solucionar a infecção por STEC oriunda dessas fontes.

Programas de saúde pública, enfatizando o perigo de se consumir leite cru e carne mal cozida também são necessários.

Uma ação conjunta entre as propriedades rurais integradas a indústria é fundamental para minimizar o risco de patógenos entrarem na cadeia alimentar humana.

### Agradecimentos

Trabalho subsidiado pela FAPESP e pela CAPES.  
Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP.

### Referências

- CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M. et al. High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.* n.70, p.111-121, 1999.
- DESCHÊNES, G.; CASENAVE, C.; GRIMONT, F. et al. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatr Nephrol.* v.10, p.203-205, 1996.
- HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci.* n.88, p.450-465, 2005.
- IRINO, K.; KATO, M. A. M.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Vet Micro.* Amsterdam, v.105, p. 29-36, 2005.
- KIRK, J. H.; PRICE, S.; WRIGHT, J. C. *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Larg. Anim. Pract.* v.18, n.2, p.16-19, 1997.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb<sub>o111</sub> and rfb<sub>o157</sub>. *J. Clin. Microbiol.* v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.
- SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* V. 34, p. 230-235, 2003.
- TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S. et al. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Vet. Microbiol.* V. 119, p. 358-365, 2007.
- WILSON, J. B.; CLARKE, R. C.; RENWICK, S. A. et al. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J Infect Dis.* v.174, p.1021-1027, 1996.