

ISOLAMENTO DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIGÊNICAS SOROGRUPOS O157 E O111 POR SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA APÓS DETECÇÃO POR PCR (NOTA DE PESQUISA)

HINIG ISA GODOY VICENTE,¹ LUIZ AUGUSTO DO AMARAL,² POLIANA DE CASTRO MELO³ E LUCIANO MENEZES FERREIRA⁴

1. Professora Doutora de Medicina Veterinária e Saúde Pública da Faculdades Adamantinenses Integradas e Médica Veterinária da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo – isahinig@hotmail.com
2. Professor adjunto da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/FCAV
3. Doutoranda em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal
4. Doutor em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a taxa de isolamento por separação imunomagnética (IMS) de cepas de *Escherichia coli* produtoras de shigatoxinas dos sorogrupos O157 e O111 em rebanhos leiteiros do Município de Jaboticabal, SP, a partir de amostras positivas, detectadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Inicialmente, amostras de fezes, água e leite foram submetidas a um processo de triagem, por meio de uma PCR multiplex, a fim de detectar a presença de seqüências *stx₁*, *stx₂* e *eae*. Submeteram-se todas as amostras positivas nesta primeira fase a uma nova reação de PCR para detecção das seqüências *rfb* O157 e O111, o que resultou em, respectivamente,

14,8% e 0,2% de amostras de fezes positivas para esses sorogrupos e 2,4% e 10,0%, respectivamente, de amostras de água e leite positivas para o sorogrupo O157. Essas amostras PCR positivas foram submetidas à IMS, obtendo-se cepas isoladas de *E. coli* O157, de apenas 53,6% das amostras de fezes. Não se isolaram cepas de *E. coli* O157 de amostras de água e leite, nem cepas de *E. coli* O111 de nenhum tipo de amostra. Concluiu-se que a IMS, embora mais sensível que outras técnicas, ainda não permite o isolamento de cepas de *E. coli* O157 e O111, de 100% de amostras PCR positivas.

PALAVRAS-CHAVES: *E. coli* O157, *E. coli* O111, PCR, separação imunomagnética shigatoxina.

ABSTRACT

ISOLATION OF SHIGATOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* SEROGROUPS O157 AND O111 BY IMMUNOMAGNETIC SEPARATION AFTER DETECTION BY PCR

The objective of this study was to verify the isolation tax by immunomagnetic separation (IMS) of strains of Shigatoxin producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O111 in dairy farms in Jaboticabal-SP, Brazil, starting from positive samples, detected by the polimerase chain reaction (PCR). Initially feces, water and milk samples were submitted to a selection process, through a PCR multiplex, in order to detect the presence of sequences *stx₁*, *stx₂* and *eae*. All of the positive samples in this first phase were submitted to a new PCR reaction targeting the sequences *rfb* O157 and *rfb* O111, what resulted in, respectively, 14.8%

and 0.2% of positive feces samples for those serogroups and 2.4% and 10.0%, respectively, of water and milk positive samples for the serogroup O157. Those PCR positive samples were submitted to IMS, isolated strains of *E. coli* O157, were obtained of only 53.6% of the feces samples. There were no isolated strains of *E. coli* O157 from water and milk samples, they were not also isolated strains of *E. coli* O111 from any sample type. In conclusion, IMS, although more sensitive than other techniques, still doesn't allow the isolation of *E. coli* O157 and O111 strains, of 100% of the PCR positive samples.

KEY WORDS: *E. coli* O111, *E. coli* O157, immunomagnetic separation, PCR, shigatoxin.

INTRODUÇÃO

Das cepas de *Escherichia coli* que produzem shigatoxinas, classificadas como *E. coli* shigatoxigênicas (STEC), existem as que são altamente patogênicas aos seres humanos e podem pertencer a uma extensa gama de sorogrupos O, sendo as *E. coli* enterohemorrágicas O157 e O111 as responsáveis pela maioria dos casos mais graves (KARMALI, 1989; PATON & PATON, 1999). Trata-se de microrganismos que são uma ameaça à saúde pública, pela gravidade das patologias que provocam, como a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos (KARMALI, 1989; VOLD et al., 1998).

A transmissão das STEC está frequentemente associada ao consumo de alimentos contaminados, particularmente carne moída e hambúrguer, crus ou malcozidos (GRIFFIN & TAUXE, 1991). O reservatório principal das STEC são os bovinos (HANCOCK et al., 1994). As STEC podem entrar na cadeia de alimentação humana de várias maneiras, mais frequentemente pela contaminação direta ou indireta da carne, após o abate, com fezes ou conteúdo intestinal contendo o patógeno (PATON & PATON, 1998).

Tendo em vista a severidade das infecções causadas por STEC dos sorogrupos O157 e O111, é essencial que métodos sensíveis sejam utilizados na determinação da prevalência e também na realização do isolamento, a fim de favorecer estudos epidemiológicos. Assim, idealizou-se o presente trabalho, com o objetivo de verificar a taxa de isolamento por separação imunomagnética (IMS) de cepas de *E. coli* produtoras de shigatoxinas dos sorogrupos O157 e O111 em rebanhos leiteiros do município de Jaboticabal, SP, a partir de amostras positivas, detectadas pela reação em cadeia da polimerase.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheram-se amostras de fezes (467), água (41) e leite (30) de dez propriedades produtoras de leite situadas no município de Jaboticabal, Es-

tado de São Paulo, no período de estiagem, entre julho e agosto de 2003, totalizando 538 elementos amostrais. As amostras foram preparadas para a realização da PCR, segundo o protocolo descrito por CERQUEIRA et al. (1999). Uma PCR *multiplex* previamente descrita (CHINA et al., 1996) foi realizada para detectar seqüências dos genes de patogenicidade *eae* e *stx*₁, *stx*₂, das *E. coli* shigatoxigênicas, utilizando, respectivamente, os pares de *primers* ep1 e ep2, stx1R e stx1F, stx2R e stx2F (BioSynthesis, United States). Os *amplicons* e respectivos pesos moleculares são: Eae – 570 pb, Stx1 – 388pb e Stx2 – 807pb.

Ep1 – 5' AGG CTT CGT CAC AGT TG 3'

Ep2 – 5' CCA TCG TCA CCA GAG GA 3'

Stx1R – 5' AGA GCG ATG TTA CGG TTTG 3'

Stx1F – 5' TTG CCC CCA GAG TGG ATG 3'

Stx2R – 5' TGG GTT TTT CTT CGG TATC 3'

Stx2F – 5' GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT 3'

Com a finalidade de identificar amostras O157 e O111 positivas, todas as amostras *stx* e *eae* PCR positivas foram submetidas a uma segunda reação de PCR para detectar genes *rfb* O157 e O111, de acordo com os procedimentos descritos por PATON & PATON (1999), usando os *primers* descritos a seguir (BioSynthesis, United States):

O157 F – 5' CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG 3'

O157 R – 5' TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC 3'

O111 F – 5' TAG AGA AAT TAT CAA GTT AGT TCC 3'

O111 R – 5' ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC 3'

Os *amplicons* e respectivos pesos moleculares são: Rfb O157 – 259 pb e Rfb O111 – 406 pb.

Para o isolamento de *E. coli* O157 de amostras O157 PCR positivas realizou-se IMS, utilizando-se esferas magnéticas contendo anticorpos para o sorogrupo O157 – Dynabeads anti-*E. coli* O157 (DynaL, Norway), segundo a técnica descrita por WRIGHT et al. (1994). Após a IMS as esferas foram ressuspendidas em 100µL de PBS-T, semeados em duplicata, 50µL em cada placa contendo Ágar McConkey Sorbitol (Oxoid, England) adicionado de 0,05mg/L de cefixima e 2,5mg/L de telurito de potássio (CT-SMAC). Após incubação à temperatura de 37°C por 18-

20 h, até 20 colônias sorbitol negativas, transparentes, e de coloração palha, foram semeadas em Tryptic Soy Ágar (TSA – Difco, France) e incubadas a 37°C, *overnight*. Após esse período, coletou-se o crescimento em, aproximadamente, 2 mL de tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS-D), e então se diluíram 100µL dez vezes em água bidestilada ultrapura. O DNA-alvo foi obtido pelo aquecimento da suspensão bacteriana diluída, por 10 minutos em banho à temperatura de 100°C, e utilizado na PCR *rfb* O157 para confirmar a positividade da colônia.

A IMS para isolamento de cepas de *E. coli* O111 foi realizada segundo a técnica descrita por SAFARIKOVA & SAFARIK (2001), utilizando esferas magnéticas com anticorpos para o sorogrupo O111 – Dynabeads EPEC/VTEC O111 (Dynal, Norway). Ao final da IMS, ressuspendem-se as esferas em 100 µL de PBS-T, sendo 50 µL semeados em placa contendo Blood Ágar-Base (Biolife, Itália), acrescido de sangue de ovino e 50 µl semeados em Agar-McConkey (Oxoid, England) e incubados a 37°C por 18-24 h. Após esse período, semearam-se dez colônias de cada meio de cultura em TSA, incubando-as a 37°C, *overnight*. De cada amostra foram preparados dois *pools* de dez colônias, extraído o DNA e realizada uma PCR *rfb* O111. Colônias individuais dos *pools* positivos foram submetidas à outra PCR *rfb* O111, que permitiu a confirmação de colônias positivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da Tabela 1, observa-se que a taxa de isolamento de cepas de *E. coli* O157 por IMS a partir de amostras de fezes PCR positivas foi de 53,6%. Nota-se também que não foram isoladas cepas a partir de amostras de água e leite. Isso indica que em algumas amostras PCR positivas não foi possível a obtenção de cepas isoladas.

Vários são os fatores que podem ter levado a essa menor taxa de isolamento de cepas de *E. coli* O157 com relação a amostras PCR positivas. Primeiro, as análises por PCR foram concluídas dentro de três meses após a colheita das amostras. Entretanto, como o material necessário à IMS

ainda não estava disponível, realizou-se o isolamento pelo menos um ano depois. Durante esse período, as amostras permaneceram estocadas a -20°C, em meio de enriquecimento com glicerol. É provável que, após o descongelamento para a realização das análises, algumas células não estivessem mais viáveis, dificultando o isolamento. Isto também foi observado por BONARDI et al. (1999) e ARTHUR et al. (2002), em trabalhos por eles realizados sob condições semelhantes. Portanto, uma vez que a PCR verifica a presença de material genético DNA ou RNA, provavelmente os microrganismos não-viáveis teriam contribuído para o número de amostras PCR positivas, mas não teriam sido isolados.

TABELA 1. Número e porcentagem de amostras de fezes de bovinos, água e leite de propriedades do município de Jaboticabal, detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR O157 positivas) e, subseqüentemente, isoladas por separação imunomagnética (IMS positivas). Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2003.

Amostras	Total	PCR O157 positivas		IMS positivas	
		Nº	%	Nº	%
Fezes	467	69,0	14,8	37,0	53,6
Água	41	1	2,4	0	0
Leite	30	3	10,0	0	0

Nas amostras em que *E. coli* O157 ou O111 estivessem presentes em pequena quantidade, o isolamento pode não ter sido bem-sucedido em virtude do volume do inóculo utilizado. Sobre esse fato, KUDVA et al. (1995) observaram que, em amostras fecais contendo baixos níveis de *E. coli* O157 (0,06 UFC/g), foi imperativo para o isolamento do microrganismo que de 1 a 10 g de fezes fossem utilizadas. Quando uma quantidade menor de material sabidamente positivo foi utilizada, como, por exemplo, um suabe de fezes, o isolamento não foi possível. Ademais, LAHTI et al. (2003) relataram isolamento de *E. coli* O157 com freqüência significativamente maior de amostras de fezes com 10g, que de amostras com 1g.

KUDVA et al. (1995) notaram também que a relação entre o material fecal e o volume do meio de enriquecimento influenciava a sensibilidade da técnica de isolamento. Por exemplo, *E. coli* O157:H7 foi isolada quando 1g de fezes foi enriquecido em 50mL de meio de cultura, o que não ocorreu quando apenas 7mL de meio foram usados no enriquecimento. Essa pode ser mais uma razão (a terceira) para a taxa de isolamento ser menor que a detecção por PCR; a quantidade de meio de cultura utilizada no enriquecimento das amostras, 10mL, nos casos em que não se logrou o isolamento, pode ter sido insuficiente.

Segundo VOLD et al. (1998), algumas cepas de *E. coli* O157 são aparentemente sensíveis ao telurito de potássio a 2,5 mg/L, concentração recomendada pelo fabricante para ser adicionada ao Sorbitol MacConkey, ágar seletivo para isolamento de *E. coli* O157 por IMS. De acordo com esses autores, a redução na quantidade de telurito para 0,65 mg/L continuou inibindo o crescimento da microbiota indesejável, enquanto o crescimento de *E. coli* O157 que não havia se desenvolvido no ágar com a concentração original de telurito foi estimulado. Neste trabalho, a quantidade de telurito de potássio utilizada foi de 2,5 mg/L, o que pode ter prejudicado o isolamento de algumas cepas de O157 possivelmente sensíveis.

Novas pesquisas podem ser realizadas a fim de verificar o melhor volume de inóculo, a relação mais adequada entre material fecal e meio de enriquecimento, e a melhor concentração de telurito de potássio a serem utilizados, otimizando a IMS.

E. coli O157 não foram isoladas das amostras de água PCR positivas, provavelmente pelos mesmos motivos já citados para as amostras de fezes, além do que, de acordo com ROSE (1990), é rara a recuperação do agente etiológico da água na maioria dos surtos de doença gastrointestinal.

Nenhuma cepa de *E. coli* O157 foi isolada a partir das três amostras de leite PCR positivas, colhidas diretamente do tanque de resfriamento. De acordo com HEUVELINK et al. (1998), o fracasso por eles obtido em tentar isolar STEC O157 de amostras de leite de tanque de resfriamento pode ter sido em virtude da diluição

das amostras contaminadas de cada animal individualmente a níveis de contaminação muito baixos, quando todo o leite foi misturado no tanque de resfriamento. Em duas investigações de rebanhos leiteiros associados à infecção em seres humanos por *E. coli* O157, os patógenos não foram isolados do leite do tanque de resfriamento, mas de amostras de leite colhidas dos animais individualmente (WRIGHT et al., 1994; MECHIE et al., 1997). Por isso, sugere-se que, quando houver necessidade de isolamento e não apenas detecção, sejam utilizadas amostras de leite de cada animal, individualmente, e não do tanque de resfriamento.

Com relação à *E. coli* O111, dados de pesquisa realizada por PATON et al. (1996) mostram que apenas três, de cinco amostras de língua O111 PCR positivas, puderam ser isoladas por meio da IMS. SAFARIKOVA & SAFARÍK (2001) também relataram que a IMS não foi capaz de isolar *E. coli* O111 de duas amostras de alface, de três que haviam sido previamente inoculadas com este sorogrupo, e atribuíram essa falha à maior contaminação por outros microrganismos, dessas duas amostras, com relação à outra, na qual o isolamento foi possível. No presente estudo, somente uma (0,2%) amostra de fezes foi O111 PCR positiva, da qual não foi isolada cepa de *E. coli* O111 por meio da IMS. Em amostras de fezes, a quantidade de microrganismos competidores é muito mais elevada que em alimentos, como os citados anteriormente, o que pode ter interferido no isolamento, mesmo utilizando-se meio seletivo. Talvez o desenvolvimento de meios de cultura que apresentem maior grau de seletividade possa elevar a taxa de isolamento.

Após todas essas considerações, vale ressaltar que o grau de sensibilidade da PCR é muito elevado, dada a sua capacidade de detectar a presença de uma única célula de STEC em meio a outros 10^8 coliformes (PATON et al., 1993). PATON et al. (1996) também verificaram que a PCR é altamente valiosa para detectar a presença de STEC em culturas de fezes e alimentos, mas que o subsequente isolamento pode ser bastante trabalhoso. ARTHUR et al. (2002), comparando a quantidade de amostras positivas para genes

stx por PCR (76,8%) e a quantidade de amostras em que STEC foram isoladas por hibridização (50,5%), concluíram que a prevalência de STEC seria subestimada se calculada com base na quantidade de STEC isoladas.

CONCLUSÃO

Concluiu-se, a partir dos resultados obtidos com a IMS, que esta técnica ainda não permite o isolamento de cepas de *E. coli* O157 e O111, de 100% de amostras PCR positivas. Assim, a utilização da detecção por PCR como método de determinação da prevalência é de grande importância para que sejam evitadas subestimativas. Entretanto, uma vez que o isolamento é de fundamental importância em estudos epidemiológicos, como na determinação de reservatórios e rotas de transmissão, novas pesquisas podem ser realizadas com a finalidade de reduzir a interferência no isolamento, provocada pelos vários fatores citados neste trabalho e, conseqüentemente, melhorar os resultados apresentados pela técnica de IMS.

REFERÊNCIAS

- ARTHUR, T. M.; BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4847-4852, 2002.
- BONARDI, S.; MAGGI, E.; BOTTARELLI, A.; PACCIA-RINI, M.L.; ANSUINI, A.; VELLINI, G.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 203-211, 1999.
- CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 111-121, 1999.
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.
- GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiological Review**, v. 13, p. 60-98, 1991.
- HANCOCK, D. D.; BESSER, T.E.; LONSEL, M.L.; TARR, P.I.; RICE, D.H.; PAROS, M.G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 199-207, 1994.
- HEUVELINK, A. E.; BLEUMINK, B.; VANDEBIGGELAAR, F.L.A.M.; GIFFEL, M.C.T. Occurrence and survival of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1597-1601, 1998.
- KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 15-38, 1989.
- KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G.; HOVDE, C. J. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1363-1370, 1995.
- LAHTI, E.; RUOHO, O.; RANTALA, L.; HÄNNINEN, M.; HONKANEN-BUZALSKY, T. Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 554-561, 2003.
- MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiology and Infection**, v. 118, p. 17-25, 1997.
- PATON, A. W.; PATON, J.C.; GOLDWATER, P.N.; MANNING, P.A. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 3063-3067, 1993.
- PATON, A. W.; RATCLIFF, R.; DOYLE, R.M.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANCER, J.A.; PATON, J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1622-1627, 1996.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3362-3365, 1999.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

ROSE, J. B. Environmental sampling for waterborne pathogens: overview of methods, application limitations and data interpretation. In: CRAUN, G. F. **Methods for the investigation and prevention of waterborne disease outbreaks**. Cincinnati, Ohio: Health Effects Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, 1990. p 223-234.

SAFARIKOVA, M.; SAFARIK, I. Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vege-

tables. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 36-39, 2001.

VOLD, L.; KLUNGSETH JOHANSEN, B.; KRUSE, H.; SKJERVE, E.; WASTESON, Y. Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. **Epidemiology and Infection**, v. 120, p. 21-28, 1998.

WRIGHT, D. J.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. **Epidemiology and Infection**, v. 113, p. 31-39, 1994.

Protocolado em: 16 nov. 2006. Aceito em: 24 jan. 2008.