

DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ERIC-PCR DE *Escherichia coli* O157:H7 ISOLADAS EM MEIAS-CARCAÇAS BOVINAS

JOICE VINHAL COSTA*
IOLANDA APARECIDA NUNES**
LEONARDO FRANÇA***

O presente trabalho objetivou identificar os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* e *E. coli* O157:H7, isoladas de superfícies de meias-carcaças quentes e resfriadas de bovinos de dois matadouros-frigoríficos do estado de Goiás, além de verificar a capacidade de discriminação dessa metodologia. A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para a caracterização molecular das 111 amostras analisadas, sendo obtidos 32 perfis distribuídos em 90 cepas de *E. coli* e oito perfis distribuídos em 16 cepas de *E. coli* O157:H7. Do total de amostras, duas cepas de *E. coli* e cinco de *E. coli* O157:H7 eram não tipáveis. Os perfis de ERIC-PCR de *E. coli* variaram de um a 18 fragmentos. Obteve-se alta discriminação entre as cepas de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 por ERIC-PCR, cujo índice foi de 0,96.

PALAVRAS-CHAVE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR; CARNE; *E. coli* PATOGENICA.

* Professora, Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, GO (e-mail: joicevinhal@gmail.com).

** Professora, Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO (e-mail: inag@terra.com.br).

*** Professor, Faculdade FAMA, Mineiros, GO (e-mail: leonardo.102@gmail.com).

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas foram identificadas novas espécies de microrganismos patogênicos e verificado o reaparecimento de agentes já conhecidos, como também foram desenvolvidos métodos mais eficazes para seu isolamento e detecção. Mudanças demográficas e alterações nos hábitos alimentares têm provocado modificações tecnológicas na indústria com relação à formulação, ao processamento e à distribuição dos alimentos. Essas modificações, associadas à habilidade dos microrganismos de se desenvolverem rapidamente e se adaptarem ao ambiente têm acarretado novos desafios para o sistema alimentar (ROWLANDS *et al.*, 2007).

O isolamento e a identificação de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos em várias regiões do Brasil devem ser considerados, uma vez que a carne pode ser contaminada nos matadouros-frigoríficos durante a evisceração dos animais, mediante contato com a pele previamente contaminada com fezes ou por contaminação cruzada (STELLA *et al.*, 2008).

A detecção de *E. coli* O157:H7 em superfície de meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas em matadouros-frigoríficos de grande porte no Estado de Goiás, cuja produção é voltada para o mercado externo, é preocupante e serve de alerta às autoridades sanitárias, quando considerada a gravidade das complicações provocadas pela doença (RIOS, 2005).

Relatos de casos esporádicos de diarreia associados à *E. coli* O157:H7, ocorridos no Brasil, mostram a necessidade de efetiva investigação epidemiológica, mediante técnicas laboratoriais avançadas para a caracterização da bactéria, assim como a busca de notificações dos casos pelos médicos e a análise laboratorial dos alimentos ingeridos.

A descoberta de que os genomas procarióticos continham sequências repetitivas de DNA expandiu as metodologias de biologia molecular para estudos de variabilidade clonal em muitas espécies bacterianas, incluindo *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI *et al.*, 2001). Em algumas técnicas moleculares de tipagem baseadas em PCR são utilizados “primers” homólogos a essas sequências, que após a amplificação geram perfil específico para cada amostra bacteriana (VERSALOVIC, KOEUTH e LUPSKI, 1991). Algumas sequências repetitivas de DNA têm sido estudadas mais detalhadamente na bactéria *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI *et al.*, 2001), sendo denominadas Sequências Consensuais Intergênicas Repetitivas Enterobacterianas (ERIC).

O número de cópias de sequências ERIC varia conforme a espécie do microrganismo. Em *E. coli*, alguns autores estimam esse número em 30 cópias (DUCHAD, RUSNIOK e FRANGEUL, 2003), enquanto outros relatam números variando de 30 a 50 (MARTIN *et al.*, 1992). As sequências ERIC diferenciam-se de outras sequências repetitivas presentes em variadas espécies e foram primeiramente descritas em *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e demais membros da família *Enterobacteriaceae*. Estão presentes apenas em regiões intergênicas, dentro de regiões transcritas (HULTON, HIGGINS e SHARP, 1991).

A técnica de ERIC-PCR tem sido utilizada como alternativa aos métodos de tipagem molecular convencionais para caracterizar enterobactérias, em especial *E. coli* de origem aviária, discriminando cepas não patogênicas e patogênicas (SILVEIRA, SILVA e CONTRERAS, 1999).

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a diversidade genética de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 em meias-carcaças bovinas quentes e resfriadas de dois matadouros-frigoríficos de grande porte de Goiânia, por meio da técnica de ERIC-PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas 111 cepas, sendo 90 de *E. coli* com sorovar não identificado e 21 cepas de *E. coli* O157:H7, isoladas de superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos de grande porte localizados em Goiânia (GO), submetidos ao Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Das 90 cepas de *E. coli* analisadas, 51 foram isoladas no matadouro-frigorífico A, enquanto que as outras 39 foram isoladas no matadouro-frigorífico B. No matadouro-frigorífico A, nove cepas pertenciam a três meias-carcaças quentes e 42 cepas a sete meias-carcaças resfriadas. No matadouro-frigorífico B, dez cepas foram isoladas de quatro meias-carcaças resfriadas e 29 cepas de duas meias-carcaças quentes.

Do total de 21 cepas de *E. coli* O157:H7, 15 pertenciam ao matadouro-frigorífico A e seis

cepas ao matadouro-frigorífico B. No matadouro-frigorífico A, *E. coli* O157:H7 foi isolada de três meias-carcaças quentes e de seis resfriadas, enquanto que no matadouro-frigorífico B, três cepas foram isoladas de uma meia-carcaça quente e as outras três cepas de uma meia-carcaça resfriada.

Utilizou-se o par de oligonucleotídeos para *E. coli* O157:H7, com as sequências (5' AAGCTCCGTGTGCCTGAA '3) e (5' GTAGGGAAGCGAACAGAG '3) (WANG LUO e ROEDER, 1997), cujo gene-alvo é o *hlyA*.

Para a extração de DNA, as culturas estocadas a -20°C em caldo Luria-Bertani (LB) suplementado com 12% de glicerol foram inoculadas em ágar MacConkey para certificação da pureza e incubadas a 37°C/24h. Uma colônia lactose positiva de cada placa foi inoculada em 5 mL de Caldo LB e incubada a 37°C/18h em estufa BOD. Após esse período, cada colônia foi centrifugada a 10.000 rpm/20 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 567 µL de tampão tris EDTA (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) para extração do DNA genômico, realizada pela metodologia descrita por Alsubel *et al.* (1992) com algumas modificações (NUNES, 1999). Após ser seco ao ar, o "pellet" de DNA obtido foi solubilizado em 100 µL de tampão TE (pH 8,0) e armazenado a -20°C.

A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas em gel de agarose a 0,8% em 0,5 XTBE, sendo a eletroforese realizada a 80V/1h em tampão 0,5 XTBE (pH 8,0). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5 mg/L), visualizado em luz ultravioleta (UV) e posteriormente fotografado para documentação. A partir das concentrações estimadas, mediante comparação visual com diluições do λ-DNA em concentrações conhecidas, foram preparadas diluições do DNA tampão TE (pH 8,0) de forma a se obter 100 ng/5 µL para amplificação.

Ato contínuo adotou-se a técnica de ERIC-PCR, a qual foi realizada em conformidade com o proposto por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991). Para amplificação utilizou-se o par de "primers" ERIC1R (5'-ATGTAA GCT CCT GCG GAT TCAC-'3) e ERIC 2 (5'-AAF TAA GTG ACT GCG GTG AGC G-'3) (INVITROGEN). A mistura da reação consistiu em 100 ng de DNA, tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase Recombinante Brasileira. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 95°C/7 min, seguindo 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 52°C/1 min e extensão a 65°C/8 min. Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em agarose a 1,2% com tampão 0,5 XTBE (pH 8,0) e corrida a 20 V/15 h. O gel foi corado com brometo de etídio (5 mg/L), visualizado em luz UV e posteriormente fotografado para documentação.

A massa molecular dos fragmentos foi calculada utilizando-se o software "Quantity One" (Bio Rad) (SILVA e MARTINS, 2006). Com base no número e tamanho dos fragmentos foram estabelecidos os perfis de ERIC-PCR. Variações na intensidade do fragmento não foram consideradas como fragmentos diferentes.

A construção do dendrograma foi efetuada a partir da introdução da matriz com os números equivalentes aos fragmentos de cada perfil no programa NTSYS-PC 2.10 (ROHLF, 2000), usando-se o coeficiente de pareamento simples.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calculou-se o índice de discriminação (ID) da técnica de acordo com o índice de diversidade de Simpson, conforme descrito por Hunter e Gaston (1998).

As relações genéticas e as divergências entre os perfis foram calculadas a partir de matriz de distância genética, definida com base na semelhança entre os diferentes "fingerprints" e representada em dendrograma construído com o método de análise "Neighbor-joining algorithm" (KUMAR *et al.*, 1996).

Os dados obtidos nos diferentes perfis do total de cepas, bem como em cada origem foram submetidos à análise de variância (ANOVA "two-way") e ao teste t de Student bi-caudal, seguindo metodologia proposta por Costa Neto (1992).

3 RESULTADOS

3.1 PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli*

Para melhor caracterização, os perfis foram identificados com a letra P seguida do número. Assim sendo, a Tabela 1 apresenta a distribuição dos perfis de ERIC-PCR de *E. coli* isoladas da

superfície de meias-carcaças bovinas. Pode-se observar que as 90 amostras analisadas distribuíram-se em 32 perfis, tendo sido verificadas duas não tipáveis (NT). No total da amostragem foram obtidas frequências de ocorrência que variaram de 1,11% a 12,22% nos diferentes perfis. Assim, os perfis P1 e P2 foram apresentados por 11/90 (12,22%) amostras cada, P9 em 03/90 (3,33%), P10 e P11 em 02/90 (2,22%) cada, P5 e P6 em 05/90 (5,55%) cada e os perfis P23, P27 e P36 em 01/90 (1,11%) cada.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli* ISOLADAS DE SUPERFÍCIE DE MEIAS-CARCAÇAS BOVINAS DE DOIS MATADOUROS-FRIGORÍFICOS - GOIÂNIA/2008

PERFIS DE ERIC-PCR	N	%
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS		
P1	11/90 ¹	12,22
P2	11/90	12,22
P18	01/90	1,11
P19	01/90	1,11
P9	03/90	3,33
P10	02/90	2,22
P11	02/90	2,22
P5	05/90	5,55
P21	01/90	1,11
P22	01/90	1,11
P12	02/90	2,22
P13	02/90	2,22
P23	01/90	1,11
P14	02/90	2,22
P25	01/90	1,11
P6	05/90	5,55
P27	01/90	1,11
P15	02/90	2,22
P32	01/90	1,11
P33	01/90	1,11
P36	01/90	1,11
P7	04/90	4,44
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES		
P8	03/90	3,33
P3	08/90	8,88
P16	02/90	2,22
P4	07/90	7,77
P26	01/90	1,11
P30	01/90	1,11
P35	01/90	1,11
P38	01/90	1,11
P17	02/90	2,22
P39	01/90	1,11
NT	02/90	2,22

¹ Número de cepas pertencentes ao perfil sobre o total de cepas analisadas.

Na Tabela 2 podem ser verificados os perfis de ERIC-PCR obtidos no total de amostras de *E. coli* isoladas da superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas de cada matadouro-frigorífico. As isoladas de superfícies de meias-carcaças dos matadouros-frigoríficos A e B distribuíram-se em 16 perfis.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli* ISOLADAS DA SUPERFÍCIE DE MEIAS-CARCAÇAS QUENTES E RESFRIADAS, SEGUNDO OS MATADOUROS-FRIGORÍFICOS A E B - GOIÂNIA/2008

PERFIL	N	%	N*	%*
MATADOURO-FRIGORÍFICO A				TOTAL
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
P4	07/09	77,78	07/55	12,72
P26	01/09	11,11	01/55	1,81
P39	01/09	11,11	01/55	1,81
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
P1	11/46	23,91	11/55	20,0
P2	11/46	23,91	11/55	20,0
P9	03/46	6,52	03/55	5,45
P10	02/46	4,35	02/55	3,63
P11	02/46	4,35	02/55	3,63
P5	05/46	10,87	05/55	9,09
P23	01/46	2,17	01/55	1,81
P14	02/46	4,35	02/55	3,63
P25	01/46	2,17	01/55	1,81
P6	05/46	10,87	05/55	9,09
P27	01/46	2,17	01/55	1,81
P33	01/46	2,17	01/55	1,81
P36	01/46	2,17	01/55	1,81
MATADOURO-FRIGORÍFICO B				TOTAL
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
P8	03/20**	15,00	03/35**	8,57
P3	08/20	40,00	08/35	22,85
P16	02/20	10,00	02/35	5,71
P30	01/20	5,00	01/35	2,85
P35	01/20	5,00	01/35	2,85
P38	01/20	5,00	01/35	2,85
P17	02/20	15,00	02/35	5,71
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
P18	01/15	6,67	01/35	2,85
P19	01/15	6,67	01/35	2,85
P21	01/15	6,67	01/35	2,85
P22	01/15	6,67	01/35	2,85
P12	02/15	13,33	02/35	5,71
P13	02/15	13,33	02/35	5,71
P15	02/15	13,33	02/35	5,71
P32	01/15	6,67	01/35	2,85
P7	04/15	26,67	04/35	11,42

*Relação às amostras totais em determinado Frigorífico.

**Consideram-se 2 amostras NT (não tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças quentes.

3.2 PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli* O157:H7

Os perfis de *E. coli* O157:H7 foram identificados com as letras PP seguidas do número. Na Tabela 3 podem ser verificados os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* O157:H7 no total analisado e nas amostras isoladas da superfície de meias-carcaças dos dois matadouros-frigoríficos. Foram obtidos quatro perfis de *E. coli* O157:H7 nas meias-carcaças quentes e resfriadas, ressaltando-se que cinco não tipáveis foram verificadas nessas últimas.

No total de amostras isoladas de superfícies de meias-carcaças do matadouro-frigorífico A (Tabela 3), as 15 cepas analisadas distribuíram-se em seis perfis com percentuais variando de 6,67% a 40,02%. Verificou-se predomínio do perfil PP1, apresentado por 06/15 (40,02%) amostras e menor ocorrência de PP3 (02/12 - 16,67%) e PP4 (01/12 - 8,33%). Nas amostras resfriadas, os perfis PP1, PP3 e PP4 foram exibidos por 06/12 (50%), 02/12 (16,67%) e 01/12 (8,33%), respectivamente.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli* O157:H7 ISOLADAS DA SUPERFÍCIE DE MEIAS-CARCAÇAS BOVINAS – GOIÂNIA/2008

PERFIL	N	%	N*	%*
MATADOURO-FRIGORÍFICO A				TOTAL
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
PP6	01/03	33,33	1/15	6,67
PP7	01/03	33,33	1/15	6,67
PP8	01/03	33,33	1/15	6,67
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
PP1	06/12**	50,00	06/15	40,02
PP3	02/12	16,67	02/15	13,34
PP4	01/12	8,33	01/15	6,67
MATADOURO-FRIGORÍFICO B				TOTAL
MEIAS-CARCAÇAS QUENTES				
PP5	01/01	100,00	01/06	16,67
MEIAS-CARCAÇAS RESFRIADAS				
PP2	03/05***	60,00	03/06	50,00

*Relação às amostras totais em determinado Frigorífico.

**Consideram-se 3 amostras NT (não tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças resfriadas.

***Consideram-se 2 amostras NT (não tipáveis) no total de isolados de meias-carcaças resfriadas.

Quanto ao total de amostras de *E. coli* O157:H7 isoladas de superfícies de meias-carcaças do matadouro-frigorífico B, as seis analisadas distribuíram-se nos perfis PP2 e PP5, com predomínio do primeiro, apresentado por 03/06 (60%) amostras, sendo as demais não tipáveis. Já o perfil PP5 foi exibido por 01/06 (16,67%) amostra.

3.3 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE AS AMOSTRAS DE *E. coli* e *E. coli* O157:H7

Visando estabelecer as relações genéticas existentes entre as amostras foi utilizado o coeficiente de pareamento simples para a análise dos dados, tendo sido construído dendrograma de similaridade (Figura 1) a partir dos 40 perfis gerados pelas amostras de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 isoladas de 20 meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B.

A similaridade entre os 40 perfis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 variou de 73,60% a 97,70%. Os perfis foram divididos em dois grupos, GI e GII, com similaridade acima de 73,60%. O Grupo GII continha apenas um perfil P22, representado por cinco cepas de *E. coli* isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico A. O grupo GI foi dividido em dois subgrupos, GI.1 e

GI.2, com similaridade de 75,60%, no qual o GI.2 foi representado apenas pelo perfil P40, com o total de quatro cepas de *E. coli* isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico B. O subgrupo GI.1 foi dividido em três “clusters”, A, B e C, com similaridade de 77,30% para os dois primeiros e de 76,80% para o C. O “cluster” C foi dividido em “subcluster”, representado pelos perfis P30, P31, P215 e P33 com similaridade de 84,30%. Esses perfis correspondem a meias-carcaças quentes e resfriadas do matadouro-frigorífico A. O “cluster” B também foi dividido por “subcluster” com similaridade de 85,50%, representado pelos perfis P10, P11 e P5 com total de nove cepas, todas isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico A.

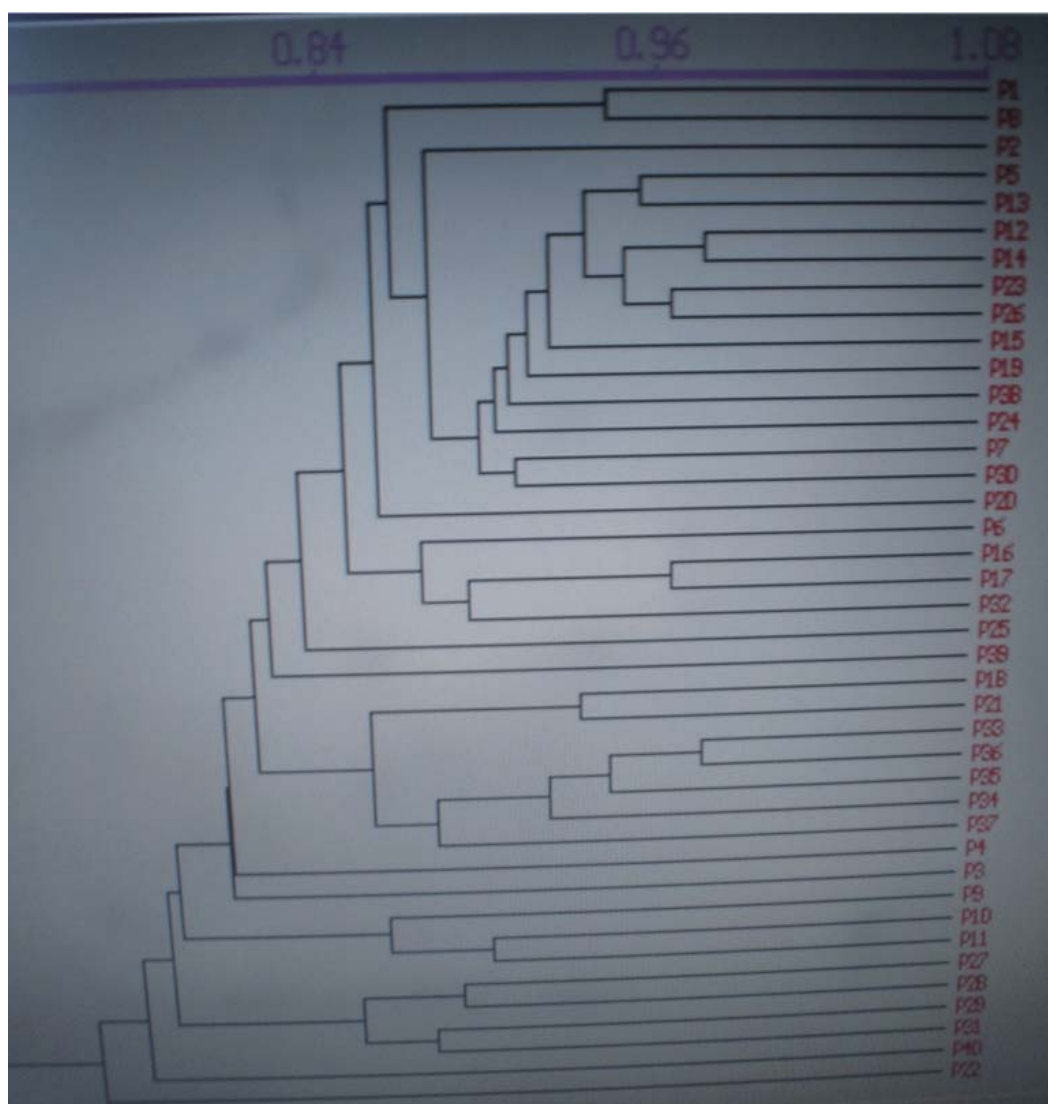


FIGURA 1 - DENDROGRAMA OBTIDO PELA TÉCNICA DE ERIC-PCR EM CEPAS DE *E. coli* e *E. coli* O157:H7 ISOLADAS DE MEIAS-CARCAÇAS QUENTES E RESFRIADAS DOS MATADOUROS-FRIGORÍFICOS A e B - GOIÂNIA/2008

As amostras que formam os perfis agrupados em GI, GII, GI.2, GI.1 e os “clusters” B e C representam apenas 27,93% do total de amostras. O restante, 72,07% foi agrupado no “cluster” que engloba um clone. O “cluster” A foi dividido em três “subclusters” A1, A2 e A3 com similaridade de 80,80%, sendo que os dois últimos foram representados por um perfil cada, P18 e P2, respectivamente. O “subcluster” A1 foi subdividido em dois novos agrupamentos, A1.1 e A1.2, com similaridade de 81,50%.

Quando analisados apenas os perfis gerados pelas amostras de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B verificam-se as relações genéticas existentes entre as mesmas (Figura 2). Nesse dendrograma de similaridade também foi utilizado o coeficiente de pareamento simples para a análise dos dados.

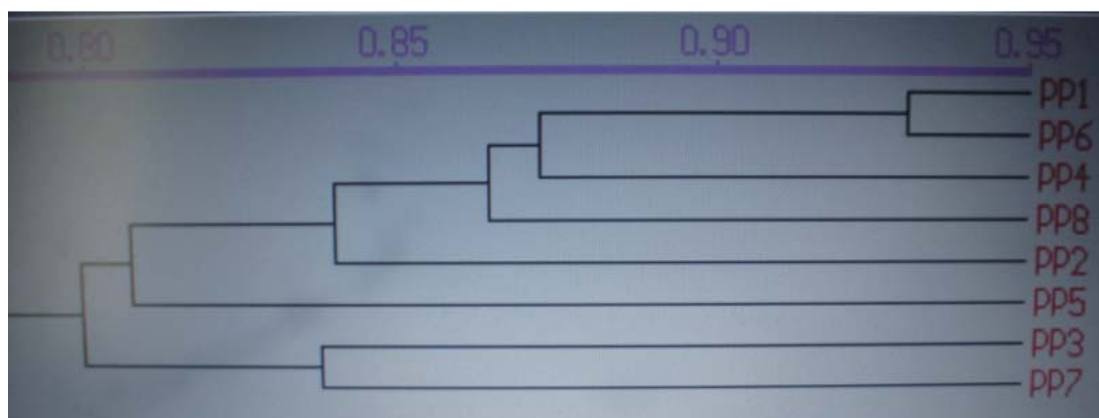


FIGURA 2 - DENDROGRAMA OBTIDO PELA TÉCNICA DE ERIC-PCR EM CEPAS DE *E. coli* O157:H7 ISOLADAS DE MEIAS-CARCAÇAS QUENTES E RESFRIADAS DOS MATADOUROS-FRIGORÍFICOS A E B - GOIÂNIA/2008

A similaridade entre os sete perfis de *E. coli* O157:H7 variou de 78,00% a 93,00%. Os perfis foram divididos em dois grupos, GRI e GRII, com similaridade de 79,80%. O Grupo GRII foi representado pelos perfis P28 e P31, identificados por cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças resfriadas e quentes do matadouro-frigorífico A, respectivamente. A similaridade entre esses perfis foi de 83,70%.

O grupo GRI foi dividido em dois subgrupos, GRI.1 e GRI.2, com similaridade de 80,70%. O subgrupo GRI.1 foi representado apenas pelo perfil PP5, identificado em uma meia-carcaça quente do matadouro-frigorífico B. O subgrupo GRI.2 foi dividido em dois “clusters”, GR.a e GR.b, com similaridade de 84,00%. O GR.b foi representado apenas pelo perfil PP2, com total de três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças resfriadas do matadouro-frigorífico B. O “cluster” GR.a foi dividido em dois “subclusters”, C e D, com similaridade de 86,40% para o C, representado apenas pelo perfil PP8 e de 87,20% para o D. O “cluster” D foi novamente dividido em agrupamento, representado pelos perfis PP1 e PP6, com similaridade de 93,00%. Esses perfis correspondem a meias-carcaças resfriadas e quentes do matadouro-frigorífico B, respectivamente.

4 DISCUSSÃO

4.1 PERFIS DE ERIC-PCR EM *E. coli*

A discriminação obtida com a técnica de ERIC-PCR foi bastante satisfatória no total analisado de *E. coli* e *E. coli* O157:H7, independente do sorovar, com Índice de Discriminação (ID) de 0,959. No entanto, não foi possível caracterizar a totalidade da amostragem por essa técnica, pois elevado percentual (23,81%) das 101 amostras não puderam ser tipadas.

A técnica de ERIC-PCR para as amostras de *E. coli* apresentou ID de 0,948, indicando a elevada capacidade de discriminação da técnica para a espécie analisada. Já o ID apenas de *E. coli* O157:H7 foi de 0,841, indicando menor eficiência para caracterização desse sorovar na amostragem analisada.

O ID obtido para o matadouro-frigorífico A, independente do sorovar, foi de 0,921. Esse índice passou a 0,894 com os resultados do ERIC para *E. coli* e para 0,757 quando *E. coli* O157:H7 foi considerada isoladamente. No matadouro-frigorífico B, o ID para *E. coli* O157:H7 foi de 0,5 em razão de poucas cepas serem positivas para *E. coli* O157:H7 e cinco delas não serem tipáveis. Além disso, as 16 cepas tipadas foram distribuídas em apenas oito perfis.

Os resultados obtidos no presente estudo concordam com os de Mohapatra *et al.* (2007), que

verificaram alta capacidade de discriminação dos métodos de caracterização molecular utilizados, como ERIC, BOX e REP-PCR na determinação e identificação de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de animais domésticos e selvagens no Canadá. Também são corroborados pelos resultados de Moura, Irino e Vidotto (2001) que constataram elevada capacidade de discriminação das técnicas de ERIC e REP-PCR. Esses autores verificaram extensa diversidade genética em cepas de *E. coli*, porém em *E. coli* aviária.

Na discriminação de *Salmonella*, a técnica de ERIC-PCR foi utilizada com sucesso por Van Lith e Aarts (1994) e por Milleman *et al.* (1996), porém Burr, Josephson e Pepper (1998) não conseguiram diferenciação dos sorotipos utilizando os mesmos “primers”.

Os perfis obtidos mostraram-se exclusivos de cada fonte. No matadouro-frigorífico A, 16 perfis foram obtidos de ERIC-PCR de *E. coli* para o total de 51 cepas analisadas. No matadouro-frigorífico B, 17 perfis foram obtidos do total de 39 cepas. Também foram encontrados diferentes perfis de *E. coli* isoladas da mesma meia-carcaça.

Em estudo realizado por Mohapatra *et al.* (2007) foram formados dois “clusters”, permitindo diferenciar as cepas de *E. coli* de fezes humanas das cepas isoladas de animais. Já no presente estudo foram formados três “clusters”, mas não completamente separados em cepas do mesmo matadouro-frigorífico ou diferenciados em cepas isoladas de meias-carcaças quentes ou resfriadas. Foram observados também vários agrupamentos diferentes formados entre as cepas de *E. coli* O157:H7.

Dombek *et al.* (2000) utilizaram as técnicas de REP e BOX-PCR para caracterização molecular de 208 cepas de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de animais. Obtiveram perfis em 125 isolados de *E. coli*, sendo que as cepas de fonte humana agruparam-se em quatro “clusters” que, no entanto, também incluíram duas cepas de aves aquáticas. Os outros isolados de fonte animal foram agrupados em quatro “clusters” diferentes. O índice de discriminação das técnicas utilizadas para diferenciar cepas de *E. coli* de fonte humana, de vacas, de ovelhas, de patos e de gansos foi de 93,8%, também inferior ao obtido no presente trabalho.

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para caracterização epidemiológica de 40 cepas enterotoxigênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia e 13 cepas isoladas do ambiente de criatórios suínos por COSTA *et al.* (2006). As amostras foram separadas em “clusters”, porém não relacionados aos fatores de virulência da bactéria e não foi demonstrado o poder discriminatório esperado da técnica de ERIC-PCR pelos autores, contrastando com os resultados aqui descritos.

4.2 PERFIS ERIC-PCR DE *E. coli* O157:H7

Foram obtidos oito perfis de ERIC-PCR de *E. coli* O157:H7 isoladas de meias-carcaças quentes e resfriadas dos matadouros-frigoríficos A e B. O índice de discriminação entre essas cepas foi de 0,841, mostrando-se menor que o obtido para *E. coli* provavelmente em função do reduzido número de cepas de *E. coli* O157:H7 avaliadas e de terem sido analisadas várias cepas isoladas da mesma amostra.

Osek (2002) utilizou a técnica de BOX-PCR para relacionar geneticamente cepas *E. coli* O157:H7 isoladas de suínos. A metodologia foi sensível o bastante para revelar diferenças genéticas entre *E. coli* O157:H7 de origem suína, apresentando-se como ferramenta rápida e conveniente para diferenciação de *E. coli* do mesmo sorogrupo.

4.3 RELAÇÕES GENÉTICAS

Neste estudo, o número de fragmentos formados pela técnica de ERIC-PCR para *E. coli* e *E. coli* O157:H7 variou de um a dezoito.

Pela técnica de ERIC-PCR, Mohapatra, Broersma e Mazumder (2008) obtiveram perfis com 4 a 13 fragmentos de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de aves, enquanto que pelas técnicas de REP-PCR e BOX-PCR foram formados perfis com seis a 18 fragmentos. Já pela técnica de (GTG)₅ foram obtidos de dez a 25 fragmentos.

Em estudo realizado por Nikam (2004), os perfis de REP-PCR de *E. coli* isoladas de aves apresentaram de um a 13 fragmentos, tendo sido verificado 100% de polimorfismo entre as cepas analisadas. Não foram observados fragmentos comuns entre os perfis obtidos. Pela técnica de BOX-PCR, os perfis variavam de um a 11 fragmentos e o polimorfismo foi de 100%. Já por ERIC-PCR foram obtidos perfis com dois a 13 fragmentos, verificando-se também 100% de polimorfismo.

Esses resultados mostram a intensa heterogeneidade, ou diversidade genética das cepas *E. coli* isoladas de aves.

Ling *et al.* (2000) observaram a heterogeneidade genética de cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de hambúrguer de frango e bovino. As cepas foram caracterizadas por ERIC-PCR e cada uma das 30 amostras analisadas apresentou perfil genético único, cujas bandas eram diferentes em cada perfil, mostrando polimorfismo entre os modelos estudados.

No presente estudo foi constatada a presença de determinados fragmentos em muitos perfis, diferenciando-se dos estudos realizados por Nikam (2004) e Ling *et al.* (2000). Porém não foi verificada a presença constante de um fragmento em todos os perfis obtidos como observado por Giammanco *et al.* (2002). Esses constataram três principais fragmentos e dois menores de massa molecular entre 200 bp e 1300 bp em todos os perfis de *E. coli* O157:H7 obtidos, independentemente da origem das cepas. A presença constante de um fragmento em todos os perfis obtidos torna a técnica de PFGE inapropriada para distinguir epidemiologicamente cepas de *E. coli* O157:H7 não relacionadas entre si.

Giammanco *et al.* (2002) estudaram 57 cepas de *E. coli* O157:H7 de “swabs” coletados do reto de bovinos e isoladas de casos de pessoas com síndrome urêmica-hemolítica e diarreia. A relação genética entre essas cepas foi estudada pela técnica de PFGE. Foram obtidos 54 perfis que apresentavam de 13 a 22 bandas e se agruparam em quatro “clusters”, evidenciando alto poder de discriminação. Essa técnica também possibilitou a demonstração da transmissão horizontal de uma única cepa de *E. coli* O157:H7 isolada de duas fazendas, assim como a caracterização de isolados relacionados a surtos alimentares.

Johnson *et al.* (1995) utilizaram a técnica de PFGE para a investigação de surto de *E. coli* O157:H7 veiculado por carne bovina. As cepas isoladas de pacientes resultaram no mesmo perfil das cepas isoladas da carne analisada, dividido em 20 fragmentos, comprovando a relação genética entre as cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de pacientes e dos alimentos implicados no surto.

Neste estudo não foi verificada a transmissão horizontal de uma única cepa de *E. coli* O157:H7, tendo em vista que os oito perfis obtidos de *E. coli* O157:H7 foram distribuídos entre cepas encontradas apenas nas meias-carcaças das quais foram isoladas.

Analisando os perfis de ERIC-PCR em *E. coli* aviária, Moura *et al.* (2001) verificaram que esses variavam de oito a 17 fragmentos e obtiveram pela técnica de REP-PCR perfis com seis a 20 fragmentos. As amostras foram agrupadas em quatro “clusters” principais, cada um com 60% de similaridade, tanto por ERIC-PCR quanto por REP-PCR, correspondendo a cepas com diferentes graus de patogenicidade. Entretanto, 28/50 (56%) das cepas patogênicas foram agrupadas em dois grupos externos a três “clusters” principais e 86% das cepas não patogênicas foram agrupadas em um “cluster” e um subgrupo. Os 32 sorotipos detectados foram distribuídos em todos os “clusters” com diferentes perfis genéticos, entretanto cepas do mesmo sorotipo tenderam a formar “clusters” com similaridade maior que 80%.

Os 40 perfis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 observados no presente trabalho distribuíram-se entre os agrupamentos formados, mas a maioria ficou no “cluster” A. *E. coli* O157:H7, o único sorotipo conhecido, ficou distribuído em oito perfis, dos quais sete agruparam-se no “cluster” A.

A grande diversidade genética observada em *E. coli* isoladas da superfície da mesma meia-carcaça ou da mesma amostra sugere contaminação com origem em múltiplas fontes, ou coexistência de diferentes sorovares na mesma amostra, já que se conhece apenas o sorovar O157:H7. A grande diversidade genética poderia ainda ser explicada devido às muitas fontes de contaminação no matadouro-frigorífico, como pele do animal, manipuladores, utensílios, equipamentos e contaminação cruzada por meia-carcaça.

5 CONCLUSÃO

No matadouro-frigorífico A foi encontrada maior variedade de perfis, tanto de *E. coli* quanto de *E. coli* O157:H7, que no matadouro-frigorífico B.

Elevada heterogeneidade genética foi observada, tanto em *E. coli* quanto em *E. coli* O157:H7, embora a maioria analisada tenha se agrupado num “cluster” principal.

Os perfis de *E. coli* O157:H7 mostraram-se exclusivos a esse sorovar e também foram específicos de cada fonte.

Verificou-se elevada ocorrência de cepas não tipáveis de *E. coli* e *E. coli* O157:H7, isoladas da superfície de meias-carcaças quentes e resfriadas dos dois matadouros-frigoríficos.

ABSTRACT

PERFILS DETECTION BY ERIC-PCR OF *Escherichia coli* AND *E. coli* O157:H7 ISOLATED ON BOVINE CARCASS

The present study aimed to characterize by ERIC-PCR *E. coli* and *E. coli* O157:H7 isolated from bovine carcass surfaces (with and without refrigeration) from two different slaughterhouse/abattoir at Goiás State (Brazil), and verify the ability of this methodology to identify different isolates of *E. coli* and *E. coli* O157:H7. ERIC-PCR technique was used for the molecular characterization of 111 samples, and it were obtained 32 fingerprints separated in 90 isolates of *E. coli* and eight fingerprints separated in 16 isolates of *E. coli* O157:H7. From the total sample, two isolates of *E. coli* and five of *E. coli* O157:H7 were non-typable. The fingerprints varied from one to 18 bands. ERIC-PCR presented high discriminatory index between *E. coli* and *E. coli* O157:H7 (0.96).

KEY-WORDS: MOLECULAR CHARACTERIZATION; MEAT; PATHOGENIC *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- 1 AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in biology**: molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1994. 459 p.
- 2 BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.24-30, 1998.
- 3 CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTA, P.; SASIPREYAJAN, J.; SVENSON, S.B. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.1, p.75-80, 2001.
- 4 COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; SPRICIGO, D.A.; WITT, N.M.; MARCHIORO, S.B.; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.
- 5 COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1992. 264 p.
- 6 DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWISKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p.2572-2577, 2000.
- 7 DUCHAUD, E.; RUSNIOK, C.; FRANGEUL, L. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **National Biotechnology**, v. 21, n.11, p.1307-1311, 2003.
- 8 GIAMMANCO, G.M.; PIGNATO, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; GIAMMANCO, G. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4619-4624, 2002.
- 9 HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.
- 10 HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n.11, p.2465-2466,1998.
- 11 JOHNSON, J.M.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K.C.; BRYANT, J.L. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-bourne outbreak. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p. 2806–2808, 1995.
- 12 KUMAR, S. *et al.* A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 13, p.584–593, 1996.
- 13 LING, O.W.; RADU, S.; RUSUL, G.; PURWATI, E.; LIHAN, S. Enterobacterial repetitive intragenic consensus (ERIC) genotyping of *Escherichia coli* O157:H7. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.3, p.35-37, 2000.
- 14 MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHEL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.3479-3483, 1992.
- 15 MILLEMANN, Y.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; LAFONT, J.P.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.14, p.129-134, 1996.

- 16 MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p.245-252, 2008.
- 17 MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; NORDIN, R.; MAZUMDER, A. Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.733-740, 2007.
- 18 MOURA, A.C.; IRINO, K.; VIDOTTO, M.C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v.45, n.1,p.173-181, 2001.
- 19 NIKAM, A.K. **Genomic fingerprinting of *Escherichia coli* strains using Repetitive Sequence Based Polymerase Chain Reaction**. 2004. 106 p. Thesis (PhD) - Department of Veterinary Microbiology, Gujarat Agricultural University, Anand, 2004.
- 20 NUNES, I. A. ***Salmonella Enteritidis* – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao RNA**. 1999. 119 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas (Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- 21 OSEK, J. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans, cattle and pigs. **Veterinary Medicine**, v.49, p.317-326, 2002.
- 22 RIOS, E.R. **Deteção de *E. coli* e *E. coli* O157:H7 em superfície de meias-carcaças de bovinos abatidos em estabelecimentos sob inspeção federal em Goiânia-GO**. 2005. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2005.
- 23 ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2000.
- 24 ROWLANDS, R.E.G; RISTORI, C.A.; FERREIRA, T.; YTO, A.Y.; FRANCO, D.L.; SCOLA, M.C.G.; JAKABI, M.; GELLI, D.S.; TAMPLIN, M.; CUNHA, T.N.; GASPARI, E.N. Produção e aplicação de novos anticorpos monoclonais na padronização de técnicas imunológicas para a detecção das bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 e toxinas Stx1, Stx2 em alimentos. **BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n.37, 2007. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa37_vibrio.htm. Acesso em: agosto de 2008.
- 25 SILVA, A.V.C.; MARTINS, A.B.G. Identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes em videira. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.801-806, 2006.
- 26 SILVEIRA, N.F.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.223-227,1999.
- 27 STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.66-74, 2008.
- 28 VAN LITH, L.A.J.T.; AARTS, H.J.M. Polymerase Chain Reaction identification of *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v .19, n.4, p.273-276, 1994.
- 29 VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- 30 WANG, Z.; LUO, T.; ROEDER, R.G. Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. **Genes & Development**, v.7, n. 11, p.2371-2382, 1997.