

## DETECÇÃO DE *Escherichia coli* EM ÁGUA DE LAVAGEM DE CARÇAÇAS DE FRANGO PELO MÉTODO DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Daiani Paulina Rissato<sup>1</sup>, Ana Paula Borgo<sup>2</sup>, João Paulo Moreira<sup>3</sup>, Ana Carolina Muller Conti<sup>4</sup>, Francielle Baptista<sup>5</sup>, Alessandra Braga Ribeiro<sup>6</sup>

### RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a detecção de *Escherichia coli* por meio da técnica de PCR utilizando a água de lavagem, sem incubação e após períodos de incubação de 24 e 48 horas, de carcaças de frango resfriadas comercializadas no município de Campo Mourão, Paraná. Para tanto, utilizou-se de uma pesquisa descritiva-exploratória com abordagem qualitativa. Para obtenção dos dados foram coletadas 33 amostras, de quatro marcas diferentes disponíveis nos mercados e açougues da cidade de Campo Mourão-PR. O trato intestinal dos humanos e outros animais de sangue quente são o principal habitat da bactéria *Escherichia coli*, a qual pertence ao grupo de coliformes a 45°C. Esta enterobactéria é uma das principais causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Devido às DTAs serem um problema mundial de saúde pública, há a necessidade de controlar a contaminação bacteriana nos alimentos, principalmente os de origem animal. Assim, as práticas de higiene e segurança alimentar são de extrema importância para evitar o consumo de alimentos contaminados. O diagnóstico de patógenos de origem alimentar continua sendo uma grande preocupação para as indústrias e para a saúde pública. Devido às exigências de eficácia, rapidez e automação dos métodos, a PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) tornou-se uma poderosa ferramenta para o diagnóstico microbiológico durante a última década. A técnica de PCR forneceu resultado positivo para *E. coli* em 8 amostras (24,2%). Analisando-se os resultados de acordo com os diferentes períodos de tempo investigados, pode-se observar que a não incubação (T0), ou incubação por 24 horas (T24) não foram suficientes para detecção desta bactéria. Conclui-se, portanto, que a PCR é eficiente para detectar *E. coli* em água de lavagem de carcaças de frango, porém, necessita-se de pré-enriquecimento com incubação de no mínimo 48 horas.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; carne de frango; reacção em cadeia da polimerase.

### DETECTION OF *Escherichia coli* IN CHICKEN CARCASS WASH WATER BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

#### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the detection of *Escherichia coli* by PCR thecnic using the chicken carcass wash water without incubation and after incubation for periods of 24 and 48 hours of refrigerated chicken carcasses sold in Campo Mourao, Parana. A descriptive and exploratory research with a qualitative approach was carried out. Data were collected from 33 samples of four different brands available in the markets and butcher shops of Campo Mourao-PR. The intestinal tract of humans and other warm blooded animals are the main habitat of *Escherichia coli*, which belongs to the group of coliforms at 45 ° C. This enterobacteria is a main cause of Foodborne Diseases (foodborne). As foodborne is a worldwide public health problem, there is the need to control bacterial contamination of foods, particularly those of animal origin. Thus, hygiene practices and food safety are of utmost importance to avoid the consumption of contaminated food. The diagnosis of foodborne pathogens remains a most important concern to industries and to public health. Due to the demands of efficiency, speed and automation methods, PCR (Polymerase Chain Reaction) has become a powerful tool for microbiological diagnosis during the last decade. The PCR gave a positive result for *E. coli* in 8 samples (24.2%). Results show that non incubation (T0) or incubation for 24 hours (T24) were not sufficient to the detection of this bacterium. Thus, CRP is effective to detect *E. coli* in the washing water from chicken carcasses, however, it is need the pre-enrichment incubation for at least 48 hours.

**colli; poultry Keywords:** *Escherichia meat; polymerase chain reaction.*

<sup>1</sup> Graduada em Farmácia pela Faculdade Integrado de Campo Mourão.

<sup>2</sup> Discente do Curso de Farmácia da Faculdade Integrado de Campo Mourão.

<sup>3</sup> Mestrando da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Docente do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade Integrado de Campo Mourão.

<sup>5</sup> Docente do curso de Ciências Biológicas da Faculdade Integrado de Campo Mourão.

<sup>6</sup> Docente do curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, a qual se apresenta na forma de bastonete Gram negativo, não esporulado e móvel na maioria dos casos (1). Pertence ao grupo dos coliformes a 45°C, antigamente denominados de coliformes fecais, podendo sua presença no alimento ser considerada como possível indicador de contaminação fecal (2).

O trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente é o principal habitat da *E. coli*. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais e estes não são considerados como parte da flora intestinal normal. A transmissão das infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (3).

Das bactérias responsáveis por gastroenterites severas, a *E. coli* é a que atinge indivíduos jovens, idosos e imunodeficientes com maior severidade (4).

A ocorrência de infecções alimentares ocasionadas por microrganismos é um problema mundial de saúde pública. Devido a esse fato, há a necessidade de controle da presença desses agentes em alimentos, principalmente os de origem animal (5).

Os principais alimentos contaminados por *E. coli* são leite não pasteurizado, água contaminada, carne crua e seus derivados (6). A produção da carne de frango depende principalmente da qualidade e da inocuidade dos produtos oferecidos à população, por isso, há uma maior exigência na avaliação da qualidade microbiológica do intenso processamento de produtos avícolas (7). Este fato é devido à carne de aves estar frequentemente envolvida em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), sendo que apresenta seu consumo aumentado nos últimos anos, devido a elevação do preço de outras fontes protéicas de origem animal e a consequente alteração de hábitos alimentares da população (8).

A infecção alimentar ocorre quando o microrganismo é ingerido e multiplica-se no organismo, causando as doenças que acometem o trato gastrointestinal na maioria das vezes (9). Desta forma, as práticas de higiene e segurança alimentar são de extrema

importância, quando os alimentos são manipulados e preparados para o consumo (10).

Os pontos críticos que envolvem a segurança alimentar compreendem o controle de temperatura de conservação, armazenagem e cozimento dos alimentos, condições higiênico-sanitárias do ambiente e manipulador, conservação dos utensílios, fonte segura do alimento e prevenção de contaminação cruzada (6).

O diagnóstico de patógenos em toda cadeia alimentar continua sendo uma grande preocupação para as indústrias e para a saúde pública. Devido às exigências de eficácia, rapidez e automação dos métodos, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tornou-se uma poderosa ferramenta para o diagnóstico microbiológico durante a última década (11). Esta técnica vem sendo utilizada para testar múltiplos fatores de virulência associados a um mesmo patógeno (12), sendo uma importante alternativa na detecção da *E. coli* em alimentos (13).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a detecção de *E. coli* por meio da técnica de PCR utilizando a água de lavagem, sem incubação (tempo zero) e após período de incubação de 24 e 48 horas, de carcaças de frango de quatro marcas diferentes na cidade de Campo Mourão, Paraná.

## MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa configura-se como descritiva-exploratória com abordagem qualitativa. Para a obtenção dos dados foram coletadas 33 amostras de carcaça de frango resfriadas, de quatro marcas diferentes disponíveis em mercados e açougues da cidade de Campo Mourão-PR. O transporte foi efetuado nas próprias embalagens do produto em caixas térmicas até o laboratório e mantidas sob refrigeração à 4°C até o momento da análise. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade Integrado de Campo Mourão.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com a água de lavagem das carcaças, a qual se constituía de solução salina peptonada tamponada 1%. Foram utilizados três períodos de tempo para as análises: T0 (tempo zero – extração da solução salina sem período de incubação),

T24 (24 horas após incubação a 37°C e T48 (48 horas após incubação a 37°C). Para extração do DNA bacteriano utilizou-se 1mL da água de lavagem da cada período avaliado, sendo a extração realizada pelo método do fenol-clorofórmio (14).

As reações foram realizadas com primers para a região altamente divergente e específica do DNA codificante do RNAr 16S e 23S de *E. coli* (primers ECO 2083 e ECO 2745 -IDT® Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, E.U.A). As condições da reação foram: 600ng de DNA extraído, 5µM de cada primer, 2,5 U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), tampão de PCR 1X - 10mM Tris-HCl, pH 8 e 50mM KCl (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 200 µM de dNTPs (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em um volume total de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Biocycler, São Paulo, Brasil), com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 57°C por 1 minuto e amplificação a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos (14).

Após a reação de amplificação, 8µL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose a 3% (Invitrogen, São Paulo, Brasil), corridos em TBE 0.5X (Biosystems Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil) (Riffon, Sayasith, et al, 2001) e corados com 10mg/mL de brometo de etídio (Biosystems Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil). Os produtos amplificados foram visualizados em transluminador (Vilber Lourmat, Biosystems Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil), sendo considerado positivo para *E. coli* a presença de fragmentos 662pb.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 33 carcaças de frango analisadas, 8 (24,2%) apresentaram resultados positivos para *E. coli*. Gonçalves (15) analisou 120 frangos de corte durante o abate aparentemente saudáveis e observou que 98,3% apresentaram *E. coli* nos sacos aéreos ou traqueias. Silva et al. (16) também pesquisaram *E. coli* em frangos de corte, onde obtiveram 25 (83,3%) amostras de fígado positivas das 30 analisadas. Estes valores são superiores ao relatado neste estudo, o qual pode ser explicado devido ao método de extração do DNA e primers utilizados serem diferentes. No presente estudo, foi utilizado o método de extração do DNA pelo fenol-clorofórmio e primers para a região altamente

divergente e específica do DNA codificante do RNAr 16S e 23S de *E. coli*. Em outros trabalhos foram utilizados primers para sequência do gene *iss* e o método de extração térmica para o DNA. Gonçalves (15) relata melhores resultados com este último método do que quando utilizado o método de fenol-clorofórmio. Estas divergências de resultados também podem ser devidas ao material analisado, pois nesta pesquisa utilizou-se a água de lavagem das carcaças e no estudo de Gonçalves (15) foram utilizados fragmentos de tecidos dos animais.

Em outro estudo realizado por Machado (17), a técnica de PCR forneceu 37,5% das amostras positivas das 40 pesquisadas. Este resultado também foi superior ao exposto no presente trabalho, podendo ser justificado novamente, pela utilização de fragmentos de tecido do animal, apesar da técnica de extração do DNA ser a mesma (fenol-clorofórmio).

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para *E. coli* em carcaças de frangos resfriados de acordo com as marcas disponíveis em mercados e açougues da cidade de Campo Mourão-PR. A marca A apresentou quatro amostras positivas para *E. coli* e a marca B não apresentou amostras positivas. As marcas C e D, apresentaram igualmente duas amostras positivas para a bactéria pesquisada.

**Tabela 1.** Resultados da detecção de *E. coli* em carcaças de frangos resfriados, em relação às marcas disponíveis em mercados e açougues da cidade de Campo Mourão, Paraná.

Marca	Número total de amostras	Amostras Positivas	
		n	%
Marca A	9	4	12,12
Marca B	8	0	0,00
Marca C	8	2	6,06
Marca D	8	2	6,06
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>8</b>	<b>24,24</b>

Os resultados obtidos na pesquisa de *E. coli* segundo os diferentes períodos de tempos investigados podem ser observados na Tabela 2. *E. coli* foi verificada apenas nas amostras cuja água de lavagem foi incubada por 48 horas (T48) a 37°C, indicando que a não incubação (T0) ou incubação por 24 horas (T24) não foram suficientes para detectar esta bactéria.

São muito escassos trabalhos que relatam a utilização da técnica de PCR com diferentes tempos de incubação para detecção

de *E. coli*. No entanto, alguns autores utilizaram esta metodologia para detecção de *Salmonella* spp. Myint et al. (18) verificaram que a etapa de pré-enriquecimento (incubação da água de lavagem) é de fundamental importância para a detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango naturalmente contaminada, uma vez que sem incubação nenhuma amostra foi positiva e com incubação (pré-enriquecimento) a sensibilidade da técnica aumentou para 79%.

**Tabela 2.** Resultados da detecção de *E. coli* em relação aos diferentes períodos de tempos investigados.

Amostras	Períodos de tempo investigados*		
	T0	T24	T48
Nº de amostras positivas	0	0	8
Nº de amostras negativas	33	33	25
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>33</b>

\* T0 amostras analisadas sem incubação; T24 amostras analisadas após 24 horas de incubação a 37 °C; T48 amostras analisadas após 48 horas de incubação a 37 °C.

Em outro estudo, Santos et al. (19) também verificaram a importância da incubação da água de lavagem, onde resultados positivos foram obtidos somente após incubação a 37°C por no mínimo 24 horas. Estes resultados são discordantes dos apresentados neste trabalho, onde somente foi possível a observação de amostras positivas para *E. coli* após incubação de 48 horas.

A técnica mais utilizada para detecção de *E. coli* em alimentos é o método microbiológico tradicional. Esta técnica possui sensibilidade e especificidade limitadas, além

de ser muito laboriosa demandando um longo tempo de análise, onde somente é possível a obtenção de resultados após seis dias. A técnica de PCR foi sensível e rápida, obtendo-se resultados em três dias de análise. Apesar dos dois métodos serem confiáveis, a técnica de PCR não é utilizado rotineiramente em indústrias e laboratórios, pois o Ministério da Agricultura não a reconhece como método oficial. Este fato pode dificultar o monitoramento microbiológico da cadeia produtiva do alimento, pois desfavorece a adoção de medidas emergenciais para conter a liberação de possíveis lotes contaminados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é eficiente para detectar *E. coli* em água de lavagem de carcaças de frango, necessita de pré-enriquecimento com incubação de no mínimo 48 horas e pode ser recomendada para detecção desta bactéria.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos gentilmente a empresa Biosystems Ltda. pela doação do DNA Ladder utilizado neste trabalho.

**Daiani Paulina Rissato, Ana Paula Borgo, João Paulo Moreira, Ana Carolina Muller Conti, Francielle Baptista, Alessandra Braga Ribeiro**

*Endereço para correspondência: Alessandra Braga Ribeiro*

*Av. Japurá, 190*

*Maringá - PR*

*87050-630*

*E-mail: alessandra.bragaribeiro@gmail.com*

*Recebido em 06/10/2010*

*Revisado em 31/03/2011*

*Aceito em 07/05/2012*

## REFERÊNCIAS

- (1) DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. San Diego, California: Academic Press, 1990. cap. 13, p. 209-216.
- (2) FRANCO, B.G.M e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- (3) PELCZAR, M.J.Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997.
- (4) KARMALL, M.A. Infeccion by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology**. Rev.2, p.15-38,1989.
- (5) RODRIGUES, L.B. **Levantamento sorológico e detecção de Salmonella em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do Estado do Rio Grande do Sul**. 2002. 88 f. Tese (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- (6) RIEMANN, H.P. & CLIVER, D.O. *E. coli* O157:H7. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.14, p. 41-48, 1998.
- (7) SOUZA, G.C. **Detecção de betalactamases de espectro (ESBL) em cepas de coliformes isoladas de carne de frango comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará**. 2007. 118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- (8) CARVALHO, L.T.; COSTA, P.S.; CARVALHO, A. L. T. Análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. **Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p.34-42, 2002.
- (9) TRABULSI, L.R CAMPOS, L.C.; **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. cap. 28, p. 215-228, 1999.
- (10) LEITE, L.H.M.; WAISSMANN, W. Doenças Trasmitidas por Alimentos na População Idosa: Riscos e Prevenção. **Revista Ciência Médica de Campinas**, v. 15, n. 6, p. 525-530, nov./dez, de 2006.
- (11) SACHSE, K. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 216, p. 3-29, 2003.
- (12) PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIS, S.; DOMINGUEZ, W. et al. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.15, n.2, p. 176-198, 2007.
- (13) GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F; BRITO, M.A.V.P.; LAGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente e amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

(14) RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P.; DROLET, M.; LAGACE, J. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2584-2589, 2001.

(15) GONÇALVES, P.M.R. **Escherichia coli com detecção do gene ISS por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate.** 2005. 84f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.

(16) SILVA, I.M.M.; NETO, E.J.; SILVA, R.M.; SILVA, N.L.; MAGALHÃES, J.; BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.333-339, 2011.

(17) MACHADO, L.S.; RODRIGUES, L.B. **Levantamento sorológico e detecção de Salmonella em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do Estado do Rio Grande do Sul.** 2010. 63 f. Tese (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

(18) MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTEA, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599-604, 2006.

(19) SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, A. R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.