

COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA EM SUSHIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE PELOTAS, RS

MARIANA ALMEIDA IGLESIAS¹; TASSIANA RAMIRES²; HELENA REISSIG SOARES VITOLA²; ADRIANA SOUTO PEREIRA NÚNCIO²; ANGELA MARIA FIORENTINI²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – maryanaiglesias@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com; helena_rsv@hotmail.com; adrianaspn@hotmail.com; angefiore@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Sushi é um tipo de alimento potencialmente perigoso ao consumidor por ser pronto para o consumo, conter ingredientes perecíveis e não possuir tratamento adicional, tal como o aquecimento, a fim de eliminar ou reduzir os micro-organismos a um nível aceitável. Atualmente, há um crescente consumo desse produto, entretanto, quando esse alimento é mantido em temperaturas de abuso e/ou manipulado sem os devidos cuidados higiênico-sanitários, há a possibilidade de contaminação por uma série de perigos, podendo resultar em casos e surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (WONG, CHENG, YU & CHAN, 2013).

A pesquisa de coliformes termotolerantes tem sido utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos. Este grupo microbiano é representado por enterobactérias capazes de fermentar a lactose a 45 °C, com produção de gás e ácido, sendo *Escherichia coli* o seu principal representante, e o indicador específico de contaminação fecal recente (TORTORA; FUNKE & CASE, 2005).

Escherichia coli, normalmente, faz parte da microbiota intestinal do homem e outros animais, sendo tipicamente não patogênicas. Entretanto, existem subgrupos de *E. coli*, denominados patotipos, que adquiriram fatores de virulência, frequentemente codificados em elementos genéticos móveis, os quais conferem uma maior capacidade de causar um amplo espectro de doenças (KAPER; NATARO & MOBLEY, 2004).

Dentre os fatores de virulência, destacam-se: a proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, responsável por mediar a ligação à célula epitelial e induzir a resposta imune; a toxina Shiga, codificada pelos genes *stx1* e *stx2*, que apresentam capacidade de causar lesões *attaching-effacing* (A/E); e a hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, responsável pela atividade hemolítica da bactéria (NATARO & KAPER, 1998; KAPER; NATARO & MOBLEY, 2004).

Pesquisas têm demonstrado que os níveis de contaminação de sushis são relativamente altos, principalmente em relação a *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, o que está diretamente relacionado a condições higiênicas insatisfatórias durante o processamento e armazenamento do alimento, bem como a práticas higiênicas inadequadas de seus manipuladores (ATANASSOVA; REICH & KLEIN, 2008). Dessa forma, torna-se essencial a análise microbiológica deste tipo de alimento, pois, quando apresenta qualidade microbiológica comprometida, pode oferecer riscos aos consumidores.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as condições higiênico-sanitárias de amostras de sushis comercializados em Pelotas, RS, bem

como caracterizar molecularmente os isolados quanto à presença de genes de virulência.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas quatro coletas entre os meses de janeiro e maio de 2016. Em cada coleta, foram amostrados seis sushis (arroz, alga e salmão cru) provenientes de sete estabelecimentos distintos da cidade de Pelotas, RS.

As amostras de sushi foram obtidas de maneira aleatória, acondicionadas em caixas isotérmicas, e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPEL para realização das análises microbiológicas, com a finalidade de isolamento e identificação de *E. coli*, conforme descrito pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2001).

Todos os isolados identificados pela metodologia convencional foram submetidos à confirmação molecular através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando-se as sequências de oligonucleotídeos derivadas do gene *uspA*, com produto de amplificação de 884 pb (CHEN & GRIFFITHS, 1998), para confirmação da espécie, e dos genes *eae* (384 pb), *hlyA* (534 pb) e *stx1* (180 pb) que codificam, respectivamente, as proteínas intimina, hemolisina e toxina Shiga, envolvidas na virulência da bactéria (PATON & PATON, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a RDC nº 12/2001, que determina os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, os sushis são considerados impróprios para consumo quando apresentarem contagem de coliformes a 45 °C superior a 10^2 NMP.g⁻¹. Sendo assim, 50 % das amostras de sushi analisadas, provenientes de sete estabelecimentos da cidade de Pelotas, foram consideradas impróprias para o consumo, uma vez que apresentaram contagens de coliformes a 45 °C, também denominados de coliformes termotolerantes, superiores ao permitido pela legislação, na coleta 1 (estabelecimentos 1, 3, 4, 5 e 6), coleta 2 (todos os estabelecimentos) e coleta 4 (estabelecimentos 2 e 3), conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da enumeração de coliformes termotolerantes (45 °C), expressos em NMP.g⁻¹, em amostras de sushi comercializadas na cidade de Pelotas, RS

Estabelecimentos	Contagens de coliformes termotolerantes			
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta
1	$4,3 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$	< 3	$4,0 \times 10^1$
2	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$4,3 \times 10^2$
3	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10^1$	< 3
4	$4,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$
5	$4,6 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$
6	$4,6 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
7	$4,0 \times 10^1$	$7,5 \times 10^4$	< 3	< 3

NMP.g⁻¹ = número mais provável por grama de alimento

Quando as amostras com contagens de coliformes termotolerantes superiores às determinadas pela legislação brasileira foram submetidas a provas

fenotípicas para confirmação da presença de *E. coli*, apenas na amostra proveniente do estabelecimento 3 (1^a coleta) foi confirmada a presença deste patógeno. O isolado de *E. coli* identificado fenotipicamente, foi submetido à confirmação molecular e portava todos os genes avaliados, conforme pode-se visualizar na Tabela 2.

Tabela 2. Presença dos genes de virulência no isolado de *E. coli* proveniente de sushis comercializados em Pelotas, RS

Isolado	Confirmação molecular (genes)			
	<i>uspA</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx1</i>
E3- coleta 1	+	+	+	+

E = estabelecimento; + = presença do gene

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os obtidos por FANG (2003), MILLARD & ROCKLIFF (2003) e ATTASANOVA; REICH & KLEIN (2008) que, ao avaliarem a qualidade microbiológica de produtos prontos para o consumo em Taiwan e de sushis na Austrália e na Alemanha, evidenciaram que 2%, 7,3% e 19,2% das amostras, respectivamente, encontravam-se contaminados com *E. coli*.

A presença dos genes *eae*, *hly* e *stx1* que codificam, respectivamente, a proteína intimina, hemolisina e toxina Shiga, no isolado de *E. coli* proveniente de sushis comercializados em Pelotas, RS, é um resultado importante, tendo em vista que os produtos destes genes estão diretamente associados à severidade das doenças causadas por *E. coli* (PATON & PATON, 1998; LAW, 2000).

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é um patógeno emergente, que vem sendo um desafio à saúde pública, uma vez que está envolvido em surtos de DTA. Esse patotipo de *E. coli* é muito virulento, apresentando baixa dose infectante e, mesmo em concentrações muito baixas no alimento (± 10 UFC), é capaz de causar infecção (CALDORIN et al., 2013).

Embora a contaminação por *E. coli* esteja comumente relacionada a produtos de origem animal, outras fontes, como vegetais e água, também podem ser veículos de transmissão do patógeno. Sendo assim, a presença de STEC nas amostras de sushi pode ser atribuída à contaminação cruzada, bem como a práticas higiênicas inadequadas de seus manipuladores, sendo um resultado importante, devido à severidade das doenças causadas por este micro-organismo.

4. CONCLUSÕES

A contagem de coliformes a 45 °C em metade das amostras de sushi analisadas foi superior à permitida pela legislação brasileira, as quais eram, portanto, impróprias para o consumo. Além disso, a presença de um isolado de STEC na amostra proveniente do estabelecimento 3 denota um risco à saúde do consumidor, uma vez que este patotipo possui alto potencial de virulência.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington, DC, 4rd ed, 2001.
- CALDORIN, M., ALMEIDA, I. A.Z.C., PERESI, J. T.M., ALVES, E. C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **BEPA** v.10, ed.110, p.4-20, 2013.
- CHEN, J., GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology.** v.27, p.369-371, 1998.
- FANG, T. J., WEI, Q. K., LIAO, C. W., HUNG, M. J., & WANG, T. H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology,** v.80 n.3, p. 241-250, 2003.
- GREENLEES, K. J., J. MACHADO, T. BELL, S. F. SUNDLOF. Food borne microbial pathogens of cultured aquatic species. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice,** v.14, p.101–112, 1998.
- HASTEIN, T., B. HJELTNES, A. LILLEHAUG, J. UTNE SKA°RE, M. BERNTSEN, A. K. LUNDEBYE. Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. **Scientific and Technical Review ,** v. 25, p.607–625, 2006.
- KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review of Microbiology.** v.2, p.23-40, 2004.
- LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*. **Applied Microbiology.** v.88, p.729-745, 2000.
- MILLARD, G., AND S. ROCKLIFF. 2003. Microbiological quality of sushi – September 2003. Disponível em: http://www.health.act.gov.au/c/health?a_da&did_10060511&pid_1094601516. Accesso em 15 de Maio de 2016.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review.** v.11, n.1, p.142-201, 1998.
- PATON, A.W., PATON, C.J., Pathogenesis and diagnosis of shiga toxinproducing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology.** v.11, p.450-479,1998.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8.ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.
- WONG, NG, Y. F., CHENG, S. L., YU, H. L., CHAN, S. W. The microbiological quality of ready-to-eat food in Siu Mei and Lo Mei shops in Hong Kong.**Food Control,** v.34, n.2 , p.547-553, 2013.