

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAR BIOFILME DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE SHIGA TOXINA

Camile Milan¹
Cláudio Dias Timm²

MILAN, C.; TIMM, C. D. Avaliação da capacidade de formar biofilme de *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 31-33, jan./jun. 2013.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilme por cepas de *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina (STEC) previamente isoladas de fezes de bovinos de corte e de leite no sul do Rio Grande de Sul, Brasil. 165 cepas foram cultivadas nas cavidades de placas de microtitulação, lavadas, retirado o sobrenadante e coradas. Após, a absorbância medida em cada cavidade foi comparada com controles negativos e positivos. Nenhuma das cepas de STEC isoladas de fezes de bovinos do sul do Brasil analisadas neste estudo apresentou capacidade de formar biofilme.

PALAVRAS-CHAVE: STEC. Bovinos. Fezes.

BIOFILM-FORMING ABILITY OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli*

ABSTRACT: This study evaluated the biofilm-forming ability of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains previously isolated from beef and dairy cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. 165 strains were grown in wells of microtiter plates, washed, the supernatant removed and stained. After, the absorbance measured in each well was compared with negative and positive controls. None of the STEC strains isolated from feces of cattle in Southern Brazil analyzed in this study showed the ability to form biofilm.

KEYWORDS: STEC. Cattle. Feces.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMAR BIOPELÍCULA DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue evaluar la formación de biopelícula por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), previamente aisladas de heces de ganado de carne y de leche, en el sur de Rio Grande do Sul, Brasil. 165 cepas han sido cultivadas en las cavidades de placas de microtitulación, lavadas, retirado el sobrenadante y coloradas. Después, la absorbencia medida en cada cavidad fue comparada con controles positivos y negativos. Ninguna de las cepas STEC aisladas de heces de ganado, en el sur de Brasil, analizadas en este estudio, demostró la capacidad de formar biopelícula.

PALAVRAS CLAVE: STEC. Bovinos. Heces.

Introdução

Escherichia coli é uma bactéria normalmente encontrada no intestino de humanos e outros animais. Embora a maioria das cepas seja apatogênica, há outras que, uma vez ingeridas, provocam distúrbios intestinais em humanos saudáveis (FENG et al., 2011). *E. coli* produtoras de shiga toxina (*shiga toxin-producing Escherichia coli* - STEC) têm sido associadas à doenças transmitidas por alimentos para humanos (BERRY; WELLS, 2010; MATHUSA et al., 2010). Os alimentos de origem animal estão entre os mais frequentemente implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos causadas por STEC (MARTIN; BEUTIN, 2011).

Uma forma racional e eficiente de evitar a contaminação dos alimentos oferecidos ao consumidor é a adoção de medidas higiênico-sanitárias durante as etapas de processamento (DONLAN; COSTERTON, 2002). A eficiência desses procedimentos fica diminuída quando há formação de biofilme nas superfícies dos equipamentos e utensílios utilizados na indústria (DONLAN; COSTERTON, 2002). O biofilme é uma comunidade de micro-organismos sésseis caracteriza-

da por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Bactérias capazes de formar biofilmes podem apresentar resistência aumentada frente a agentes antimicrobianos, quando comparadas à bactérias planctônicas (JOSEPH et al., 2001). Em consequência da menor eficiência da higienização e sanitização das superfícies, os biofilmes podem constituir fontes crônicas de contaminação microbiana aos alimentos (STEPANOVIC et al., 2004).

A capacidade de formação de biofilme por STEC sobre diferentes superfícies, como aço inoxidável, vidro, borracha e poliestireno tem sido demonstrada (RYU; BECHAUT, 2004; BISCOLA, 2009). Entretanto, não há estudos abordando as cepas de STEC que ocorrem no sul do Brasil. A ocorrência em bovinos de STEC formadoras de biofilme pode constituir-se em fonte de contaminação para equipamentos e utensílios utilizados em frigoríficos, cuja sanitização poderá ficar dificultada devido à presença de biofilme, dessa forma aumentando o risco de contaminação dos produtos cárneos oferecidos aos consumidores. Nesse sentido, o

¹Graduanda de Medicina Veterinária, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas, RS;

²Professor de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: timm@ufpel.tche.br.

objetivo deste trabalho foi pesquisar a formação de biofilme por *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina isoladas de fezes de bovinos do sul do Rio Grande de Sul.

Material e Métodos

Foram utilizadas 165 cepas de STEC previamente isoladas de fezes de bovinos de leite e de corte em estudo realizado por Timm et al. (2007) no Rio Grande do Sul, Brasil (para maiores detalhes sobre a origem e obtenção dos isolados, consultar o artigo mencionado). Os isolados estocados foram recuperados em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia, Michigan, USA) e avaliados quanto à capacidade de produção de biofilme em placa de microtitulação com fundo em "U" (*Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark*), conforme técnica descrita por Møretro et al. (2003), com modificações.

Culturas *overnight* a 37°C em BHI foram padronizadas por meio de espectrofotometria a 600 nm para o valor 1. Após, foram diluídas a 1:10 em BHI com 1% (m/v) de glicose. Aliquotas de 200 µL da suspensão de células de cada isolado foram distribuídas nas cavidades das placas e incubadas a 37°C por 24 horas. As placas foram, então, lavadas três vezes com 200 µL de solução salina 0,1% (m/v) para remoção das células que não aderiram à placa e secadas por inversão. As células aderidas foram coradas com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v) por 15 minutos. O corante foi removido e, após secagem por 2 horas, a absorbância a 630 nm foi determinada. Os isolados que apresentaram $A_{630} \geq 1,0$ foram definidos como formadores de biofilme. As cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas LIPOA 2017, sabidamente produtora de biofilme, e LIPOA 2018, não formadora de biofilme, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Resultados e Discussão

Todas as 165 cepas de STEC estudadas apresentaram absorbância $A_{630} < 1,0$, não demonstrando capacidade de formar biofilme.

Apesar da alta incidência de enfermidades causadas por STEC na Argentina (LÓPEZ et al., 1997), no Brasil somente casos esporádicos têm sido reportados (CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002; IRINO et al., 2002; VAZ et al., 2004; NISHIMURA et al., 2005) e mesmo os registros da presença de STEC em alimentos são poucos (CERQUEIRA et al., 1997; BERGAMINI et al., 2004). Em estudo realizado na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, Timm et al. (2009) não identificaram a presença dos genes responsáveis pela produção de shiga toxina em 464 *E. coli* isoladas de 50 amostras de carne moída e 50 de leite cru. Uma razão para essa disparidade entre países vizinhos com hábitos alimentares similares pode se dever a diferenças nos mecanismos de adaptação de STEC a condições de estresse, o que pode ter implicação na capacidade da bactéria sobreviver em diferentes alimentos e nos ambientes em que são produzidas (MOLINA et al., 2003). Embora no presente trabalho não tenham sido estudadas cepas isoladas na Argentina ou outros países, os resultados indicam que as cepas que ocorrem em bovinos no sul do Brasil não têm capacidade de formar biofilme e, portanto, têm características menos favoráveis à permanên-

cia na superfície de equipamentos que poderiam constituir fontes de contaminação na indústria e alimentos do que cepas formadoras de biofilme. A formação de biofilme, além de dificultar a eliminação dos micro-organismos das superfícies em que se encontram, também confere certa resistência da bactéria a antimicrobianos (ITO et al., 2009).

Por outro lado, Boerlin et al. (1999) sugerem que STEC isoladas de humanos constituem uma população diferente das STEC encontradas em bovinos ou que sejam apenas uma subpopulação destas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar esta questão.

Conclusão

Cepas de STEC isoladas de fezes de bovinos do sul do Brasil não apresentaram capacidade de formação de biofilme. É possível que este fato tenha relação com a ainda não reportada ocorrência de STEC em alimentos na região e o reduzido número de casos clínicos registrados em humanos. Entretanto, estes resultados não devem ser interpretados como um motivo para abrandamento do controle sanitário de animais e alimentos, uma vez que as cepas de STEC que ocorrem em determinada localidade podem sofrer alterações em decorrência dos intercâmbios de portadores entre regiões e países.

Referências

- BERGAMINI, A. M. M. et al. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de carne coletadas nas regiões de Ribeirão Preto e Campinas, SP. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 30, 2004.
- BERRY, E. D.; WELLS, J. E. *Escherichia coli* O157:H7: Recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 60, p. 67-117, 2010.
- BISCOLA, F. T. **Pesquisa da formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2009.
- BOERLIN, P. et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 497-503, 1999.
- CANTARELLI, V. et al. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 266-270, 2000.
- CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 177-180, 1997.

- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: Survival Mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 167-193, 2002.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**, Chapter 4A, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 4 jul. 2013.
- GUTH, B. E. C. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 535-536, 2002.
- IRINO, K. et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 466-447, 2002.
- ITO, A. et al. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4093-4100, 2009.
- JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.
- LÓPEZ, E. L. et al. Perspectives on Shiga-like toxin infections in Argentina. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1458-1462, 1997.
- MARTIN, A.; BEUTIN, L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 99-104, 2011.
- MATHUSA, E. C. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9, p. 1721-1736, 2010.
- MOLINA, P. M.; PARMA, A. E.; SANZ, M. E. Survival in acid and alcoholic medium of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. **BMC Microbiology**, v. 3, n. 17, 2003.
- MØRETRØ, T. et al. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003.
- NISHIMURA, L. S.; SOUZA, R. L.; GUTH, B. E. C. Identificação de um caso de síndrome hemolítica urêmica relacionado à infecção por *Escherichia coli* produtora da toxina shiga O157 no estado de São Paulo, Brasil. In: BRAZILIAN CONGRESS ON MICROBIOLOGY, 23., 2005, Santos. **Anais...** Santos, Brazil, CD.
- RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 247-254, 2004.
- STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.
- TIMM, C. D. et al. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 648-656, 2009.
- TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 419-425, 2007.
- VAZ, T. M. I. et al. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 903-905, 2004.

Recebido em: 05/04/2013

Aceito em: 05/07/2013

HOSPITAL VETERINÁRIO UNIPAR

Setor de Cirurgias



Rod. PR 480, s/n, Km 14, Campus II - 87500-000 - Umuarama - PR
Fone: (44) 3621-2550

