Resultado de Pesquisa

IMPACTO DO FATIAMENTO NA CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS MUÇARELA POR *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

**BIANCA PEREIRA DIAS**

Universidade Federal do Norte do Tocantins

biianca.p.dias@gmail.com

**JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR**

Universidade Federal do Norte do Tocantins

ribeirojuniorjc@gmail.com

**DENISE AMORIM DOS SANTOS**

Universidade Federal do Norte do Tocantins

denise.santos@ufnt.edu.br

1. Apresentação e Justificativa

 O queijo muçarela é um dos derivados lácteos mais consumidos no Brasil. Sua praticidade de utilização culinária e outros requisitos sensoriais são muito apreciados pelos consumidores brasileiros. Na maioria das vezes, é comercializado no comércio varejista fatiado. Esse processo, apesar de altamente demandado pelos consumidores, no entanto, pode prejudicar a qualidade microbiológica do produto (Ribeiro Júnior et al., 2020).

 Sabe-se que a manipulação dos produtos de origem animal contribui para a inclusão de contaminantes microbiológicos. O contato com equipamentos e manipuladores durante o fatiamento, quando realizado de forma não higiênica, pode comprometer a qualidade e segurança microbiológica desses alimentos (Brasil, 2020), muitas vezes prontos para consumo e sem qualquer tratamento térmico que possa eliminar esses perigos microbiológicos (Machado‐Moreira et al., 2019).

 Nesse contexto, a *Escherichia coli*, indicadora de contaminação de origem fecal, pode ser utilizada para verificar a adoção de medidas higiênico-sanitárias pelos manipuladores durante a etapa de fatiamento (Nataro & Kaper, 1998; Douëllou et al., 2017). Além disso, muitas cepas de *E. coli* podem ter fatores de virulência que podem vir a comprometer a segurança desses produtos para o consumo (Altalhi & Hassan, 2009) principalmente as estirpes diarreiogênicas, como a enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina shiga (STEC), enterohemorrágica (EHEC), interoinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e enterotoxigênica (ETEC) (Gomes et al., 2016; Wanjala, Nduko & Mwende, 2018).

1. Objetivos

Determinar o efeito do fatiamento do queijo muçarela nas quantificações de *Escherichia coli* e caracterização molecular de fatores de virulência de estirpes diarreiogênicas em um laticínio da região norte do Tocantins.

Os objetivos específicos:

-Quantificar *E. coli* em amostras de queijo tipo muçarela inspecionadas antes e após a etapa de fatiamento em um laticínio da região norte do Tocantins;

-Purificar, isolar e extrair o DNA de *E. coli* oriundas de amostras de muçarela íntegra (peça) e após a etapa de fatiamento;

-Determinar, por meios moleculares, a ocorrência de estirpes diarreiogênicas de *E. coli* em queijos muçarela íntegro e fatiado; e,

-Verificar o efeito do fatiamento na quantificação e ocorrência de *E. coli* diarreiogênica em queijos muçarela regularmente inspecionados em um laticínio da região norte do Tocantins.

1. Metodologia

Foram avaliadas 20 peças de queijo tipo muçarela produzidas em um laticínio de Augustinópolis, norte do Tocantins. Antes da etapa de fatiamento, as peças de muçarela foram removidas de suas embalagens plásticas originais e coletadas 100 g da peça íntegra. Após a etapa do fatiamento, no próprio laticínio, uma nova amostra de 100g, da mesma peça, foi coletada em Bag plástica estéril. As amostras foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), onde foram imediatamente analisadas.

De cada amostra foi retirada assepticamente uma alíquota de 25g representativa de toda a peça do produto e homogeneizada em Stomacher com 225mL de água peptonada tamponada em saco plástico tipo Bag estéril e realizada a diluição decimal seriada. As diluições decimais seriadas foram inoculadas em *Compact Dry*® EC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão), conforme as recomendações do fabricante, e incubadas a 35 ± 1ºC por 48 horas. Para quantificação de *E. coli*, sendo consideradas somente as colônias azuis. Todos os isolados típicos foram primeiramente recuperados em caldo cérebro-coração e submetidos à extração de DNA genômico (gDNA) conforme Ribeiro Júnior et al. (2016) para análise em PCR na pesquisa dos genes codificadores dos fatores de virulência de *E. coli* utilizando os primers e condições de amplificação descritos por Aranda et al. (2004) apresentadas no Quadro 1.

As PCRs foram realizadas em dois ensaios multiplex para cada isolado de acordo com a seguinte constituição: 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada dNTP, 2,5 μL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl2, 20 pmol/L de cada primer, 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. A amplificação foi realizada em termociclador (BioRad) utilizando os protocolos descritos no Quadro 1. Os produtos então amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados em solução de brometo de etídio a 20mg/L por 20m e documentados sob luz ultravioleta. No Quadro 1 estão representados os amplicons característicos de cada patótipo de *E. coli* pesquisado, exceção de EHEC, para o qual serão considerados os isolados que apresentarem o gene *eaeA* simultaneamente com o gene *stx1* e/ou 2.

**Quadro 1.** Genes que codificam fatores de virulência de *Escherichia coli*, *primers* iniciadores, produtos esperados e condições de amplificação conforme Aranda et al. (2004).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Gene** | ***Primers***  | **pb** | *E. coli* | **Amplificação**  |
| *eaeA* | CTGAACGGCGATTACGCGAA | 917 | EPEC | 95ºC-5m 40x (95º-40s, 58ºC-60s, 72ºC- 2m) 72ºC-7m  |
| CCAGACGATACGATCCAG |
| *CVD* | CTGGCGAAAGACTGTATCAT | 630 | EAEC |
| CAATGTATAGAAATCCGCTGTT |
| *stx1* | ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC | 180 | STEC |   95ºC-5m 40x (95ºC-45s, 50ºC-60s, 72ºC- 1min) 72ºC-7m     |
| AGAACGCCCACTGAGATCATC |
| *stx2* | GGCACTGTCTGAAACTGCTCC | 255 |
| TCGCCAGTTATCTGACATTCTG |
| *LT* | GGCGACAGATTATACCGTGC | 450 | ETEC |
| CGGTCTCTATATTCCCTGTT |
| *ST* | ATTTTTMTTTCTGTATTRTCTT | 190 |
| CACCCGGTACARGCAGGATT |
| *ipaH* | GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC | 600 | EIEC |
| GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC |

1. Resultados

Das 20 amostras analisadas, todas apresentaram contagem inferior a 10 atendendo os padrões exigidos na Instrução Normativa n° 161 de 1° de julho de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2022), legislação vigente. Em relação à pesquisa molecular de estirpes diarreiogênicas de *E. coli* (EPEC, EAEC, STEC, ETEC, EIEC), nenhuma amostra apresentou isolados positivos.

 O resultado obtido era esperado já que os queijos analisados foram produzidos em um laticínio que opera regularmente conforme o regime de inspeção federal (SIF).

1. Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos, vale ressaltar a importância do procedimento padrão de higiene operacional (PPHO) cujo objetivo é evitar a contaminação direta ou cruzada durante o contato com os utensílios ou superfície dos equipamentos e procedimentos dos manipuladores

1. Referências Bibliográficas

Altalhi AD, Hassan SA. Bacterial quality of raw milk investigated by Escherichia coli and isolates analysis for specific virulence-gene markers. Food Control. 2009; 20(10): 913-917.

Aranda KRS, Fagundes Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5849-5853.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução normativa n° 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº10.468 de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, que dispõe sobre o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.

Douëllou T, Delannoy S, Ganet S, et al. Molecular characterization of O157: H7, O26: H11 and O103: H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products. Int J Food Microbiol. 2017; 253: 59–65.

Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, et al. Diarrheagenic Escherichia coli. Braz J Microbiol. 2016; 47: 3-30.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 142–201.

Ribeiro Júnior JC, Tamanini R, Soares BF, et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. Semin-Cienc. Agrar. 2016; 37(5): 3069-3078.

Ribeiro Júnior, J. C., dos Santos, I. G. C., Dias, B. P., et al. (2020). Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. Arch of Vet Sci, 2020; 25(2).

Wanjala, W. N., Nduko, J. M., Mwende, M. C. Coliforms Contamination and Hygienic Status of Milk Chain in Emerging Economies. J Food Qual Haz Control, 2018; 5(1):3-10.

1. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil