



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Pinho Coval

**Pesquisa de Fatores de Patogenicidade de
Escherichia coli isoladas de Géneros Alimentícios
e de Ambientes de Produção Alimentar**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e
coorientação da Dra. Maria Margarida Saraiva e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019



Catarina Pinho Coval

**Pesquisa de Fatores de Patogenicidade
de *Escherichia coli* isoladas de Géneros
Alimentícios e de Ambientes de
Produção Alimentar**

Tese no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, sob orientação da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e coorientação da Dra. Maria Margarida Saraiva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Coimbra, julho de 2019

O estudo apresentado nesta dissertação foi realizado no laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, localizado no Porto.

Agradecimentos

If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.

Isaac Newton

Realizar uma tese de Mestrado implica não só muito de nós como muito de quem nos rodeia e, fundamentalmente, nos apoia ao longo das várias fases por que passamos. Se não nos pudéssemos apoiar nos “ombros de gigantes” seria, certamente, tudo muito mais complicado. Quero, então, desta forma, expressar o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que fizeram parte deste percurso.

Agradeço, em primeiro lugar, às instituições que tornaram possível a realização deste Mestrado, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, no Porto, em especial ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição, a todos os colaboradores a elas pertencentes, pelas pessoas maravilhosas que demonstraram ser, pela disponibilidade que demonstraram sempre para comigo e pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

À Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa, pela realização da sequenciação necessária a este trabalho.

À Dra. Margarida Saraiva, por ter aceitado ser minha orientadora no DAN-INSA, pelo tempo despendido e por todo o conhecimento científico transmitido.

À Dra. Teresa Lopes pela disponibilidade sempre demonstrada, pela paciência, pelo tempo despendido, pela preocupação constante, por todo o conhecimento transmitido e pela boa disposição diária.

À minha orientadora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva por me ter possibilitado a realização desta dissertação, pela preocupação constante, pelas palavras de motivação e por todo o conhecimento transmitido. Tenho a certeza que não poderia ter escolhido melhor profissional para me acompanhar e orientar neste percurso. Muito obrigada!

À minha turma de Mestrado pelos bons momentos passados juntos, pelo companheirismo e partilha, pelas gargalhadas e boa disposição constante. Sem vocês não seria a mesma coisa! Para nós, a maior sorte do Mundo!

Durante estes anos conheci outras pessoas que estarão, para sempre, no meu coração: Carla Gomes, Joana Teigão e Francisco Sousa. Obrigado pela amizade, pelas conversas, pela sinceridade, pelas gargalhadas, pelo companheirismo e por todos os bons momentos partilhados. Química até morrer!

Aos amigos da terrinha, Helena, Eduardo e Sofia um muito obrigado por todos os momentos de descontração que são sempre tão bons e que são tão importantes, principalmente, em alturas como esta.

À minha Mariana, a melhor pessoa que Coimbra me podia ter dado, a irmã mais velha que a vida se encarregou de me dar, uma das melhores escolhas da minha vida, a ti, um super obrigada por todas as conversas, por todos os conselhos, por acreditares sempre em mim e nunca me deixares desistir, por nada nem ninguém, e por, mesmo apesar da distância que nos separa, nunca estarmos longe uma da outra. Foste, por muitas vezes, o meu porto de abrigo quando mais ninguém se apercebia que eu estava à deriva!

Ao Tiago, por todo o incentivo, motivação, carinho, amor e paciência nesta fase mais complicada e por me lembrar, sempre, que sou capaz.

Em último, mas com a maior importância, agradeço do fundo do meu coração, à minha família, que sempre esteve presente e apoia-me incondicionalmente. Especialmente a vós, mãe e pai, obrigado por tudo o que representam para mim e por me apoiarem sempre. Não conseguirei, nunca, por palavras, agradecer tudo aquilo que fizeram por mim ao longo do meu percurso académico. São e serão sempre o meu porto de abrigo.

A vós, avó Felismina e avô Manuel Joaquim, ou avô do bigode, como eu, carinhosamente te chamava quando era mais pequenina, onde quer que estejam, estarão sempre presentes na minha vida e nas minhas conquistas. Espero que estejam orgulhosos por mais esta etapa!

A todos, muito obrigada!

Índice

Índice de Tabelas	ix
Índice de Figuras	xiii
Lista de Abreviaturas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xxi
I. Introdução	3
I.1. Segurança alimentar.....	3
I.2. Doenças microbianas de origem alimentar.....	3
I.3. <i>Escherichia coli</i>	4
I.3.1. Características gerais.....	4
I.3.2. Estirpes patogénicas e mecanismos de patogenicidade.....	6
I.3.2.1. <i>E. coli</i> enteroagregativa.....	6
I.3.2.2. <i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	8
I.3.2.3. <i>E. coli</i> enteropatogénica.....	9
I.3.2.4. <i>E. coli</i> enterotoxigénica.....	11
I.3.2.5. <i>E. coli</i> verotoxigénica ou produtora de Shiga toxina.....	12
I.3.3. Manifestações clínicas.....	13
I.3.4. Tratamento.....	15
I.3.5. Epidemiologia.....	15
I.3.5.1. Reservatórios e Transmissão.....	15
I.3.5.2. Incidência e surtos.....	17
I.3.6. Prevenção e controlo.....	18
I.4. Técnicas de Biologia Molecular: PCR simples, PCR multiplex e eletroforese.....	19
2. Objetivos	25
3. Metodologia	29
3.1. Seleção de primers.....	29
3.2. Estirpes bacterianas.....	30
3.3. Extração de ADN.....	31
3.3.1. Otimização de condições para o processo da extração de ADN e sensibilidade do método.....	31
3.3.1.1. Obtenção de <i>E. coli</i> a partir de estirpes isoladas.....	31
3.3.1.2. Extração de ADN.....	33

3.4. Otimização de condições da PCR para os genes de virulência com estirpes controlo positivo	37
3.4.1. PCR simples para cada gene.....	37
3.4.2. Otimização de condições da PCR para os genes <i>aaiC</i> e <i>aggR</i> (genes de virulência de EAEC), <i>ipaH</i> e <i>bfpA</i> (genes de virulência de EIEC e EPEC, respetivamente)	40
3.4.3. PCR das amostras.....	44
3.5. Sequenciação dos produtos da PCR.....	45
4. Resultados	49
4.1. Otimização de condições para a extração de ADN e sensibilidade do método	49
4.1.1. Com estirpes controlo positivo	49
4.1.2. Teste da PCR duplex em estirpes amostra para os genes <i>estA</i> e <i>eltB</i> característicos do patotipo ETEC	52
4.2. Otimização das condições da PCR para os genes de virulência com estirpes controlo positivo	57
4.3. Teste da PCR para identificação de <i>E. coli</i> patogénicas isoladas de géneros alimentícios	80
4.4. Resultados da sequenciação dos produtos da PCR	85
4.5. Origem alimentar das estirpes.....	87
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	91
5.1. Conclusões.....	91
5.2. Perspetivas futuras.....	92
6. Referências Bibliográficas	95
Anexo	101
Anexo I.....	103

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Número de casos confirmados de infeção entérica, entre 2002 e 2012, pelos principais patotipos de <i>E. coli</i> em Portugal: casos de infeções por ETEC, EPEC, STEC, EAEC e casos onde os fatores de virulência de ETEC e STEC foram detetados simultaneamente (Adaptado de Silveira <i>et al.</i> , 2013).....	18
Tabela 2 – Primers utilizados para a deteção da presença/ausência dos fatores de patogenicidade.....	29
Tabela 3 – Estirpes controlo positivo presentes no INSA utilizadas para a deteção da presença/ausência dos fatores de patogenicidade e respetivos tamanhos dos fragmentos esperados	30
Tabela 4 – Volumes utilizados na mistura para testar a deteção dos genes característicos de VTEC em PCR simples (ISO 13136:2012).....	34
Tabela 5 – Perfil térmico a usar no termociclador para os genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> (ISO 13136:2012)	34
Tabela 6 – Volumes utilizados na mistura para testar a deteção dos genes <i>eltB</i> e <i>estA</i> em PCR duplex (Adaptado de Campos <i>et al.</i> , 2015, Nguyen <i>et al.</i> , 2005 e Fujioka <i>et al.</i> , 2013)...	35
Tabela 7 – Volumes utilizados na mistura para testar a deteção dos genes <i>eltB</i> e <i>estA</i> em PCR simples (Adaptado de Campos <i>et al.</i> , 2015, Nguyen <i>et al.</i> , 2005 e Fujioka <i>et al.</i> , 2013)...	35
Tabela 8 – Perfil térmico usado para testar condições para a deteção dos genes <i>eltB</i> e <i>estA</i> (Adaptado de Campos <i>et al.</i> , 2015, Nguyen <i>et al.</i> , 2005 e Fujioka <i>et al.</i> , 2013).....	35
Tabela 9 – Preparação da mistura da PCR para cada gene	38
Tabela 10 – Perfis térmicos para cada PCR de cada gene, excetuando os genes característicos da VTEC/STEC.....	39
Tabela 11 – Perfil térmico usado para otimizar condições para a deteção dos genes <i>aaiC</i> e <i>aggR</i> (Adaptado de Boisen <i>et al.</i> , 2012)	40
Tabela 12 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a deteção do gene <i>ipaH</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	40
Tabela 13 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a deteção do gene <i>ipaH</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	41
Tabela 14 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a deteção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	41
Tabela 15 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a deteção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	41

Tabela 16 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene <i>bfpA</i> , com adição de iões Mg^{2+} (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004)	42
Tabela 17 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene <i>bfpA</i> , com adição de iões Mg^{2+} (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004)	42
Tabela 18 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene <i>bfpA</i> (Mohammadeh <i>et al.</i> , 2017).....	42
Tabela 19 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Mohammadeh <i>et al.</i> , 2017).....	43
Tabela 20 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene <i>bfpA</i> (Alikhani <i>et al.</i> , 2006).....	43
Tabela 21 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Alikhani <i>et al.</i> , 2006).....	43
Tabela 22 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene <i>bfpA</i> (Huaisai <i>et al.</i> , 2012)	43
Tabela 23 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Huaisai <i>et al.</i> , 2012).....	44
Tabela 24 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene <i>bfpA</i> (Li <i>et al.</i> , 2012)	44
Tabela 25 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Li <i>et al.</i> , 2012)	44
Tabela 26 – Perfil térmico para a PCR de sequenciação	45
Tabela 27 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	67
Tabela 28 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	68
Tabela 29 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	70
Tabela 30 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	70
Tabela 31 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	72
Tabela 32 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene <i>bfpA</i> (Adaptado de Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	73

Tabela 33 – Misturas a utilizar para a realização da PCR para cada gene, após otimização das condições	78
Tabela 34 – Perfis térmicos otimizados para a PCR para cada gene	79
Tabela 35 – Perfil térmico a utilizar na PCR dos genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i> (VTEC) e <i>eae</i> (EPEC)....	79
Tabela 36 – Resultados da PCR para as pools	80
Tabela 37 – Resultados obtidos na sequenciação dos produtos amplificados em estirpes-amostras positivas	86
Tabela 38 – Relação entre as estirpes positivas e o género alimentício	87

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EAEC (Adaptado de Kaper <i>et al.</i> , 2004).....	7
Figura 2 – Representação esquemática do plasmídeo de virulência pAA2 (Adaptado de Andrade, 2013)	8
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EIEC (Adaptado de Kaper <i>et al.</i> , 2004).....	9
Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EPEC (Adaptado de Kaper <i>et al.</i> , 2004).....	9
Figura 5 – Lesões <i>attaching/effacing</i> (A/E) no enterócito (Adaptado de Blum, 2014).....	10
Figura 6 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de ETEC (Adaptado de Kaper <i>et al.</i> , 2004).....	11
Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EHEC (Adaptado de Kaper <i>et al.</i> , 2004).....	13
Figura 8 – Representação esquemática da PCR (Adaptado de Garibyan e Avashia, 2013) ..	21
Figura 9 – Representação esquemática da eletroforese (Adaptado de https://socratic.org/questions/why-is-gel-electrophoresis-used)	22
Figura 10 – Aspeto das colónias de <i>E. coli</i> β-glucuronidase positivas em TBX agar (Adaptado de Technical Data Sheet, TBX Agar, Biokar diagnostics).....	32
Figura 11 – Mecanismo da reação que ocorre em TBX agar (Adaptado de Technical Data Sheet, TBX Agar, Biokar diagnostics)	32
Figura 12 – Amplificação por PCR, para o gene <i>stx1</i> , de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água	49
Figura 13 – Amplificação por PCR, para o gene <i>stx2</i> , de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água.....	50
Figura 14 – Amplificação por PCR, para o gene <i>eae</i> , de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água.....	51
Figura 15 – Teste das condições para a otimização da amplificação por PCR, para os genes <i>eltB</i> e <i>estA</i> , para testar condições para a otimização	52
Figura 16 – Amplificação por PCR, para os genes <i>eltB</i> e <i>estA</i> , em duplex, de ADN extraído por fervura de estirpes isoladas de alimentos, a partir a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas	53
Figura 17 – Amplificação por PCR, para os genes <i>estA</i> , de ADN extraído por fervura, a partir a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas	54

Figura 18 – Amplificação por PCR, para os genes <i>eltB</i> , de ADN extraído por fervura, a partir a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas	55
Figura 19 – Amplificação por PCR, para o gene <i>eltB</i> , de ADN extraído por fervura de 10 “pick-up” de colónias de LMV_E39 em 100µL de água e diluições	56
Figura 20 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>pCVD432</i>	57
Figura 21 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>astA</i>	58
Figura 22 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>aaiC</i>	59
Figura 23 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>aggR</i>	60
Figura 24 – Amplificação por PCR para otimizar condições com gradiente crescente de temperatura de emparelhamento para o gene <i>aaiC</i>	61
Figura 25 – Amplificação por PCR para otimizar condições com gradiente crescente de temperatura de emparelhamento para o gene <i>aggR</i>	62
Figura 26 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>ipaH</i>	63
Figura 27 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>ipaH</i>	64
Figura 28 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene <i>ipaH</i>	65
Figura 29 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> . 65	
Figura 30 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> . 66	
Figura 31 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> . 67	
Figura 32 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente crescente de temperaturas.....	68
Figura 33 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente crescente de temperaturas.....	69
Figura 34 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente de temperaturas.....	71
Figura 35 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente de temperaturas.....	71
Figura 36 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente de temperaturas.....	72
Figura 37 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> com gradiente de temperaturas.....	73
Figura 38 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> segundo Mohammadeh <i>et al.</i> (2017)	74
Figura 39 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> segundo Alikhani <i>et al.</i> (2006).....	75

Figura 40 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> segundo Huasai <i>et al.</i> (2012)	76
Figura 41 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene <i>bfpA</i> segundo Li <i>et al.</i> (2012)	77
Figura 42 – Amplificação por PCR, para o gene <i>astA</i> , de ADN extraído por fervura, a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas	81
Figura 43 – Amplificação por PCR, para o gene <i>estA</i> , de ADN extraído por fervura, a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas	82
Figura 44 – Amplificação por PCR, para o gene <i>astA</i> , de ADN extraído por fervura, a partir de estirpes isoladas	84
Figura 45 – Amplificação por PCR, para o gene <i>estA</i> , de ADN extraído por fervura, a partir de estirpes isoladas	85

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP _c	Monofosfato cíclico de adenosina
a _w	Atividade de água
BCIG	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucorónico
BFP	“Bundle-forming pilus”
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPW	Água peptonada tamponada
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DFWED	Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC adherence factor
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GMP _c	Monofosfato cíclico de guanósina
HACCP	“Hazard Analysis and Critical Control Point” – Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P.
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO	International Organization for Standardization
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCEZID	National Center for Emerging and Zoonotic Infections Diseases
pb	Par de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase
Pet	“Plasmid-encoded toxin” – Toxina codificada por plasmídeos
rpm	Rotações por minuto
SUH	Síndrome Urémico-Hemolítico
TBX	“Tryptone Bile X-glucuronide”

Tir	Translocated intimin receptor
UE	União Europeia
UFC	Unidade formadora de colónia
UTI	Unidade de Tecnologia e Inovação
VTEC ou STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de verotoxina / Shiga toxina

Resumo

Escherichia coli faz parte da microbiota do trato intestinal de organismos de sangue quente. No entanto, algumas estirpes possuem fatores de virulência que afetam processos celulares nos humanos causando doenças do trato gastrointestinal (e extraintestinal). As estirpes enteropatogénicas são classificadas com base nos seus mecanismos de patogenicidade, local e mecanismo de aderência, da seguinte forma: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* verotoxigénica/produtora de Shiga toxina (VTEC/STEC), entre outras. As estirpes são transmitidas maioritariamente via fecal-oral, através da ingestão de produtos contaminados, água ou alimentos, devido às más práticas agrícolas, e más práticas de higiene e de fabrico na produção e distribuição alimentar. Os métodos fenótipos são frequentemente utilizados para o isolamento e a identificação do patotipo é confirmada por métodos moleculares, através da deteção de genes de virulência específicos.

De forma a isolar e detetar estirpes patogénicas de *E. coli* em alimentos para consumo humano, o principal objetivo deste trabalho foi montar um protocolo para a deteção de fatores de virulência de *E. coli* patogénicas, que possa ser usado na rotina laboratorial, por PCR convencional e, sempre que possível, em PCR multiplex, que permite num só ensaio detetar simultaneamente vários genes, e conseqüentemente identificar com maior rapidez a estirpe. O método por PCR é mais rápido, tem menores custos e apresenta alta sensibilidade e especificidade. Propus-me a otimizar as condições da PCR para deteção de 11 genes de virulência de cinco patotipos diferentes:

EAEC: genes *pCVD432*, *astA*, *aggR* e/ou *aaiC*;

EIEC: gene *ipaH*;

EPEC: genes *eae* e/ou *bfpA*;

ETEC: genes *eltB* e/ou *estA*;

VTEC/STEC: genes *stx1* e/ou *stx2*.

O isolamento e identificação do patotipo permitirá a análise filogenética e a investigação de surtos, o que poderá permitir estabelecer uma relação entre uma toxinfecção alimentar e o género alimentício que a provocou.

O trabalho experimental foi iniciado pela otimização de condições de extração de ADN em estirpes padrão, e posteriormente, nas amostras. O processo de otimização da PCR foi complexo tendo-se feito vários ensaios com variação das condições de PCR,

nomeadamente, o tempo de emparelhamento e/ou o tempo da extensão, a temperatura de emparelhamento, a concentração de primers e a concentração de ADN na mistura da PCR, de forma a obter os produtos amplificados esperados. Foi possível otimizar individualmente a PCR para 10 dos 11 genes (dos quais não se conseguiu otimizar as condições para o gene *bfpA*). Conseguiu-se otimizar uma PCR multiplex para os genes característicos de *E. coli* verotoxigénica/produtora de Shiga toxina: *stx1* e *stx2*.

Das amostras estudadas (n=100), e tendo sido realizadas “pools” de 10 amostras, encontrou-se uma baixa percentagem de genes de virulência e diversidade de patotipos: 6% EAEC e 1% ETEC. O gene mais frequentemente encontrado foi o *astA* (6%) da EAEC. Todos os genes detetados estavam presentes em alimentos crus ou que podem ter sido adicionados pós-processamento pelos manipuladores de alimentos com as mãos.

Apesar dos resultados não serem alarmantes, indicam a presença de patotipos associados a reservatórios humanos em alimentos prontos para consumo e por isso, deve-se continuar a monitorizar a presença de patotipos de *E. coli* em géneros alimentícios e as suas vias de transmissão de forma a efetivar ações de melhoria que promovam a Segurança Alimentar. Deve-se continuar a alertar a população e, em especial, os manipuladores de alimentos, para os riscos da contaminação de alimentos, principalmente os que serão consumidos crus, com bactérias de origem fecal. Este trabalho poderá contribuir em prol da Saúde Pública visto que a identificação dos diferentes patotipos de *E. coli* pode contribuir para detetar potenciais reservatórios, fontes de contaminação e vias de transmissão, para além de poder contribuir também para a instituição de medidas de controlo imediatas e para a prevenção, através de vacinas e novos tratamentos, de doenças diarreicas provocadas por *E. coli*.

Palavras-chave: Segurança Alimentar, *Escherichia coli*, PCR, trato gastrointestinal, fatores de virulência.

Abstract

Escherichia coli is part of the microbiota of the intestinal tract of warm-blood organisms. However, some strains express virulence factors that affect cellular processes in humans causing diseases of the gastrointestinal (and extraintestinal) tract. Enteropathogenic strains are classified based on their pathogenicity mechanisms, local and mechanism of adherence, as follow: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and *E. coli* verotoxigenic/Shiga toxin producing (VTEC/STEC), among others. The strains are mostly transmitted via faecal-oral, through the ingestion of contaminated products, water or food, due to bad agricultural practices, and bad hygiene and manufacturing practices in food production and distribution. Phenotype methods are often used for the isolation and the patotype is confirmed by molecular methods, through the detection of specific virulence genes.

In order to isolate and detect pathogenic strains of *E. coli* in food for human consumption, the main objective of this work was to set up a protocol for the detection of pathogenic *E. coli* virulence factors that can be used in the laboratory routine by conventional PCR and, whenever possible, multiplex PCR, which allows in a single assay to simultaneously detect several genes, and consequently to identify the strain. PCR is faster, has lower costs and has high sensitivity and specificity. I proposed to optimize the conditions by conventional PCR for the detection of 11 virulence genes from five different pathotypes:

EAEC: genes *pCVD432*, *astA*, *aggR* and/or *aaiC*;

EIEC: gene *ipaH*;

EPEC: genes *eae* and/or *bfpA*;

ETEC: genes *eltB* and/or *estA*;

VTEC/STEC: genes *stx1* and/or *stx2*.

The isolation and identification of the pathotype will allow phylogenetic analysis and outbreaks investigation, which may allow establishing a relationship between a food infection and the foodstuff that caused it.

The experimental work was initiated by the optimization of DNA extraction conditions in standard strains, and later in the samples. The PCR optimization process was complex with several studies with variables of the PCR conditions, namely, annealing time and/or extension time, annealing temperature, primer concentrations and DNA concentration at mixing the PCR to obtain the amplified products expected. It was possible to optimize the PCR for 10 of the 11 genes (from which the conditions for *bfpA* gene could not be optimized) individually. It

was possible to optimize a multiplex PCR for the characteristic genes of *E. coli* verotoxigenic/Shiga toxin producing: stx1 and stx2.

From the samples studied (n=100), and having pools of 10 samples, a low percentage of virulence genes and diversity of pathotypes was found: 6% EAEC and 1% ETEC. The gene most frequently found was astA (6%) from EAEC. All detected genes were present in raw foods or that may be added post-processing by hand good handlers.

Although the results are not alarming, they indicate the presence of pathotypes associated with human reservoirs in ready-to-eat food and therefore, the presence of *E. coli* pathotypes in foodstuff and their transmission routes and alert for the improvement actions that promote Food Safety. The population and, in particular, food handlers should continue to be alerted for the risks of food contaminations, especially those that will be eaten raw with faecal bacteria. This work may contribute to Public Health since the identification of the different *E. coli* pathotypes can contribute to detect potential reservoirs, sources of contamination and transmission routes, as well as to contribute to the establishment of immediate control measures and for the prevention, through vaccines and new treatments, of diarrheal diseases caused by *E. coli*.

Keywords: Food Safety, *Escherichia coli*, PCR, gastrointestinal tract, virulence factors.

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1. Segurança alimentar

O *Codex Alimentarius* define “Segurança Alimentar” como sendo a garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor quando são preparados ou consumidos de acordo com o uso a que se destinam (*Codex Alimentarius Commission*, 2003).

É desejo do consumidor que os produtos alimentares sejam seguros, ou seja, que estejam isentos de microrganismos patogénicos, de resíduos químicos, ou de qualquer outro tipo de contaminante, no entanto, é fácil perceber a facilidade com que pode ocorrer uma contaminação durante qualquer etapa “do prado ao prato”, nomeadamente durante a produção primária, a preparação, o transporte, a distribuição, o armazenamento, a exposição e/ou a venda de um alimento (Duarte, 2010), daí a importância da aplicação da Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (do inglês: Hazard Analysis and Critical Control Point – HACCP). Contudo, nos últimos anos, na Europa, o número de casos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos tem vindo a diminuir (EFSA e ECDC, 2018), provavelmente devido ao aumento da consciencialização da população quanto às práticas seguras aquando da manipulação dos géneros alimentícios e devido a recomendações e mudanças na lei sobre a manufatura e preservação dos alimentos.

I.2. Doenças microbianas de origem alimentar

As doenças de origem microbiana (incluindo bactérias e/ou toxinas, vírus e parasitas), transmitidas por alimentos, continuam a ser um problema grave e atual em Saúde Pública a nível mundial. A Organização Mundial de Saúde estima que 600 milhões de pessoas – quase 1 em cada 10 pessoas no Mundo – adoecem depois de ingerir alimentos contaminados e 420 mil morrem anualmente devido a doenças diarreicas, das quais 125 mil são crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2017).

Segundo Baptista e Antunes (2005), um alimento pode causar doenças por diversos motivos: por existirem nele microrganismos patogénicos e/ou pela produção de toxinas, podem, ainda, causar quadros clínicos de doença por terem sido contaminados com alguma substância tóxica ou por terem sido adicionadas substâncias para modificar alguma das suas características, e que, devido às interações com o género alimentício tornam-se tóxicas para o ser humano, entre outros.

Para que ocorra doença transmitida por alimentos, por via da ação de agentes biológicos, os microrganismos patogénicos ou a sua toxina terão de estar presentes no alimento. No entanto, esta não é condição suficiente para que a doença ocorra. É também necessário que o microrganismo patogénico esteja presente em quantidade suficiente para causar doença ou para que ocorra a produção da toxina no alimento. Será necessário que o alimento permaneça numa “temperatura de perigo” por tempo suficiente para que o microrganismo se multiplique e/ou produza a toxina, que o alimento seja capaz de sustentar o crescimento de microrganismos patogénicos ou que seja ingerida uma quantidade suficiente de alimento (contaminado pelo microrganismo) que provoque doença (dose infetante) ao indivíduo (Baptista e Antunes, 2005).

A dose infetante é variável de microrganismo para microrganismo e depende do hospedeiro pois os indivíduos que pertençam a grupos de risco, como pessoas com um sistema imunitário imaturo ou deprimido, crianças, grávidas e idosos são afetados com uma dose infetante menor do que as restantes pessoas.

1.3. *Escherichia coli*

1.3.1. Características gerais

Escherichia coli, que até 1920 era designada por *Bacterium coli* (Willshaw et al., 2000), pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor Escherich (Doyle e Padhye, 1989) como uma bactéria com forma bacilar, não formadora de esporos e Gram-negativa (Willshaw et al., 2000) que é móvel por flagelos. Relativamente aos testes bioquímicos, *E. coli* é oxidase-negativa, fermentadora de glucose com produção de ácido e, normalmente, com produção de gás (Willshaw et al., 2000) e fermentadora de lactose, o que se pode observar através do aparecimento de colónias vermelhas ou cor-de-rosa em agar MacConkey (Croxen et al., 2013). Algumas *E. coli* são produtoras da enzima β -glucuronidase, o que se pode verificar quando a bactéria apresenta colónias azuis ou azuis-esverdeadas, no meio cromogénico Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) agar, caso a *E. coli* em questão não seja produtora desta enzima, surgem colónias de cor branca.

E. coli é uma bactéria indicadora de contaminação fecal visto que está presente no trato intestinal dos animais de sangue quente e normalmente não se multiplica em água nem em géneros alimentícios refrigerados. A presença de *E. coli* em alimentos processados por calor indica que pode ter ocorrido uma falha no processo ou, mais comumente, contaminação pós-processamento através dos equipamentos ou dos manipuladores de alimentos ou através

do contacto com alimentos crus contaminados. Assim a presença de *E. coli* em alimentos processados não é indicadora somente de contaminação fecal direta, sem intermediários. A presença de *E. coli* num alimento implica também um risco de que outros patógenos entéricos possam estar presentes.

Esta bactéria apresenta as seguintes condições para o seu crescimento e sobrevivência:

1. Temperatura: *E. coli* apresenta uma temperatura ótima de crescimento (temperatura à qual a taxa de crescimento é máxima) de 37 °C, mas consegue crescer em intervalos de temperatura mais alargados entre 15 e 45 °C e por isso é designada como mesófila. Há ainda estirpes de *E. coli* que conseguem resistir a temperaturas de 55 °C durante 60 minutos ou a temperaturas de 60 °C durante 15 minutos. As estirpes patogénicas de *E. coli* sobrevivem e multiplicam-se, embora mais lentamente, às temperaturas de refrigeração. Quando os produtos são armazenados a -20 °C, ocorre, por norma, uma ligeira redução da quantidade de microrganismos (Willshaw *et al.*, 2000).
2. pH: *E. coli* classifica-se como uma bactéria neutrófila, pois apresenta um pH ótimo de crescimento entre 6,0 a 8,0 (Guerreiro, 2012). O pH mínimo para o crescimento da bactéria em questão é de 4,0 a 4,5, no entanto, este valor depende de diversos fatores como a matriz alimentar ou a temperatura a que a matriz se encontra. Estudos revelam que a resistência a ácidos por parte de *E. coli*, em especial o serotipo O157:H7, pode aumentar a tolerância a outras variantes ambientais como o aquecimento ou a radiação (Meng *et al.*, 2007).
3. Atividade de água (a_w): o intervalo ideal de a_w para o crescimento de *E. coli* é entre 0,966 e 0,997, sendo que o valor mínimo de a_w que permite o crescimento de *E. coli* é 0,95 (Ross *et al.*, 2002 e WHO, 2018).
4. Relação com o oxigénio: a bactéria em estudo, tendo condições de cultura e os nutrientes essenciais, consegue crescer em meios com ou sem oxigénio e é por isso classificada como aeróbia facultativa (Willshaw *et al.*, 2000).
5. Radiação: *E. coli* é destruída por radiação ultravioleta (UV) e por todas as radiações com frequências superiores, como os raios-x e a radiação gama. A utilização de radiação na dosagem correta para eliminar os microrganismos patogénicos permite manter as características organolépticas do alimento (Meng *et al.*, 2007).

1.3.2. Estirpes patogénicas e mecanismos de patogenicidade

A maioria das estirpes de *E. coli* colonizadas do intestino não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro. No entanto, algumas estirpes causam gastroenterite devido a fatores de virulência que possuem.

Os fatores de virulência são componentes de um microrganismo que determinam a sua capacidade para provocar doença, mas não são necessários para a sua viabilidade. Têm sido caracterizados em duas classes: toxinas biológicas, muitas das quais são exotoxinas, e adesinas, moléculas com capacidade de aderir à superfície e possibilitar ao microrganismo colonizar e invadir o hospedeiro (Paradela, 2008). Para o desenvolvimento deste estudo é importante a identificação de genes característicos de virulência para cada patotipo de *E. coli*.

E. coli patogénicas foram classificadas, com base nos seus mecanismos de patogenicidade, da seguinte forma:

E. coli enteroagregativa (EAEC);

E. coli enteroinvasiva (EIEC);

E. coli enteropatogénica (EPEC);

E. coli enterotoxigénica (ETEC);

E. coli verotoxigénica ou produtora de Shiga toxina (VTEC ou STEC);

E. coli de aderência difusa (DAEC);

E. coli aderente-invasiva (AIEC).

1.3.2.1. *E. coli* enteroagregativa

E. coli enteroagregativa é uma estirpe com a capacidade de produzir fímbrias de aderência, toxinas *Pet* (Plasmid-encoded toxin) e/ou toxinas termoestáveis (ST), denominadas EAST (toxinas termoestáveis enteroagregativas).

As fímbrias de aderência facilitam a colonização inicial das EAEC na superfície intestinal. Algumas estirpes de EAEC possuem fímbrias de aderência agregativa I (AAF/I), que se tratam de estruturas fimbriais de *bundle-forming*. Após a colonização inicial, esta estirpe estimula a secreção de muco intestinal que leva à formação de um biofilme que, para além de proteger as EAEC da atividade de antibióticos e das células do sistema imunitário (leucócitos), vai segregando citotoxinas e enterotoxinas para o interior do enterócito, proporcionando uma

colonização persistente e uma redução da absorção dos nutrientes por parte dos enterócitos (Nataro e Kaper, 1998) (Figura 1).

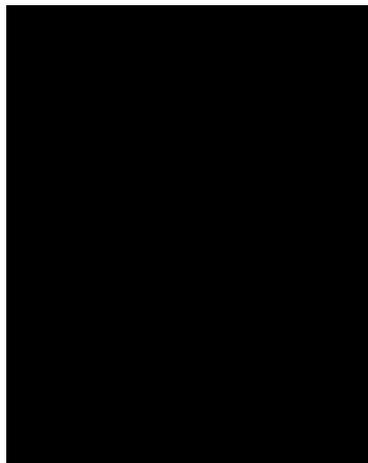


Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EAEC (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004)

A presença do plasmídeo de virulência pAA (Figura 2), característico deste patotipo (Nüesch-Inderbinem *et al.*, 2013) pode ser codificada por 3 genes distintos: o gene *pCVD432* (Aranda *et al.*, 2004) é específico da presença deste plasmídeo e codifica a formação de estruturas fimbriais, no entanto, a sua deteção por PCR convencional é muito pouco sensível (Navarro-Garcia e Elias, 2016), o que torna complicada a sua deteção, o gene *aggR*, que também codifica a formação de estruturas fimbriais, é responsável pela expressão de outros genes de virulência plasmidiais e cromossomais (Boisen *et al.*, 2008, Boisen *et al.*, 2012 e Vasconcellos, 2009) e o gene plasmidial *astA* (Boisen *et al.*, 2008), codificador da toxina termoestável característica deste patotipo de *E. coli* (Boisen *et al.*, 2012 e Gyles, 2007).

O gene *aaiC* (Boisen *et al.*, 2012) é um gene cromossomal regulado pelo gene *aggR* que codifica o sistema de secreção do tipo VI. O sistema de secreção do tipo VI é constituído por complexos proteicos que promovem a translocação de proteínas para o interior de células-alvo (Jensen *et al.*, 2014).

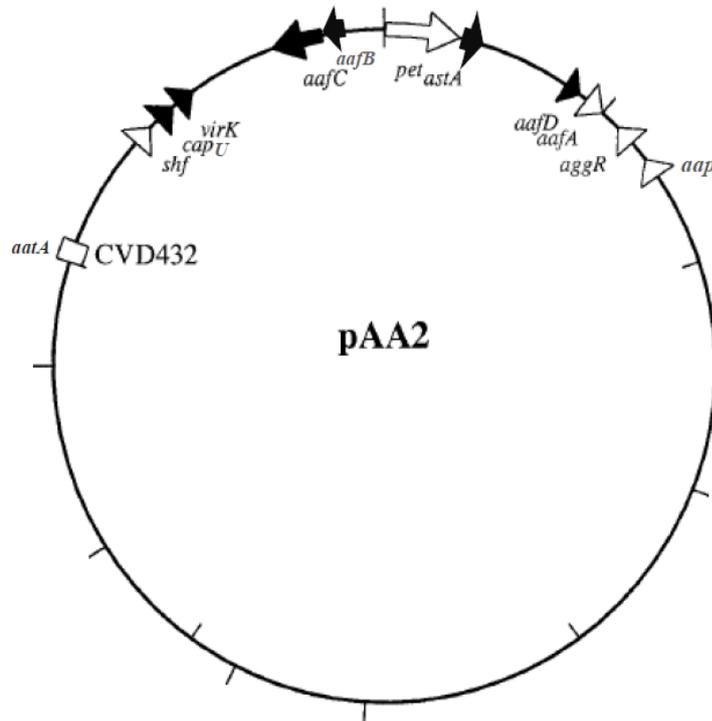


Figura 2 – Representação esquemática do plasmídeo de virulência pAA2 (Adaptado de Andrade, 2013)

O critério mínimo para se poder classificar uma *E. coli* como enteroagregativa ainda não se encontra bem definido. Segundo Klein *et al.* (2015), pode-se classificar uma EAEC como típica caso se detete, juntamente com o gene *pCVD432*, o gene *aggR* ou atípica na ausência deste mesmo gene. A diferença mais visível entre uma EAEC típica ou atípica encontra-se na forma como se manifesta clinicamente, pois a EAEC atípica não apresenta diarreia como manifestação clínica, ao contrário da EAEC típica (Nüesch-Inderbinem *et al.*, 2013). Segundo EFSA (2015), os genes alvo na pesquisa de EAEC devem ser os genes *aaiC* e *aggR*. Segundo Navarro-Garcia e Elias (2016), deve-se detetar pelo menos um dos genes característicos para a formação de estruturas fimbriais (*aggR* ou *pCVD432*), que também são indicadores da presença do plasmídeo pAA, e o gene cromossomal *aaiC*.

1.3.2.2. *E. coli* enteroinvasiva

E. coli enteroinvasiva (EIEC) não produz toxina (Doyle e Padhye, 1989), contudo, os enterócitos são invadidos pela bactéria que lisa o fagossoma e adquire mobilidade pelo citoplasma conseguindo, assim, proliferar para as células adjacentes e causar morte celular (Meng *et al.*, 2007 e Willshaw *et al.*, 2000) (Figura 2).



Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EIEC (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004)

Para a identificação da EIEC deve-se detetar o gene *ipaH* (Aranda *et al.*, 2004), que pode estar presente num plasmídeo ou no cromossoma das células e que é o gene responsável pela codificação de proteínas envolvidas no processo de invasão da bactéria às células hospedeiras (EU Reference Laboratory for *E. coli*, 2013 e Rodrigues, 2014).

1.3.2.3. *E. coli* enteropatogénica

O mecanismo de patogenicidade de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) caracteriza-se, segundo Willshaw *et al.* (2000), pela formação de microcolónias graças aos *bundle-forming pilus* (BFP), que conferem aderência da bactéria aos enterócitos e que, conseqüentemente, provoca lesões *attaching and effacing* (A/E) nas células epiteliais, destruição das células do intestino delgado responsáveis pela absorção, inibição do transporte de eletrólitos e de água nos enterócitos e conseqüente diarreia rápida com alguma resposta inflamatória (Rodrigues, 2014). O mecanismo de patogenicidade da EPEC caracteriza-se também pela ligação da bactéria ao enterócito, por formação de um pedestal rico em actina sob a bactéria (Meng *et al.*, 2007) (Figura 4).

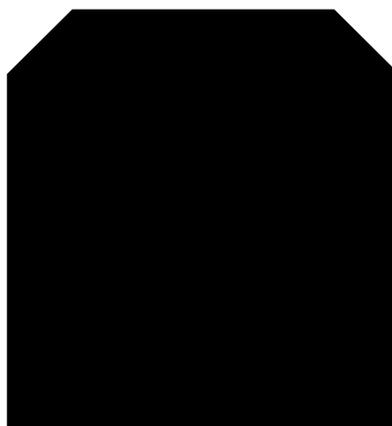


Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EPEC (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004)

As lesões A/E são lesões histopatológicas caracterizadas pela aderência da bactéria à membrana citoplasmática do enterócito, através da degeneração localizada das microvilosidades do enterócito e do estabelecimento de um pedestal rico em componentes do citoesqueleto da célula hospedeira no local de contacto da bactéria (Nataro e Kaper, 1998 e Teixeira *et al.*, 2015) (Figura 5).

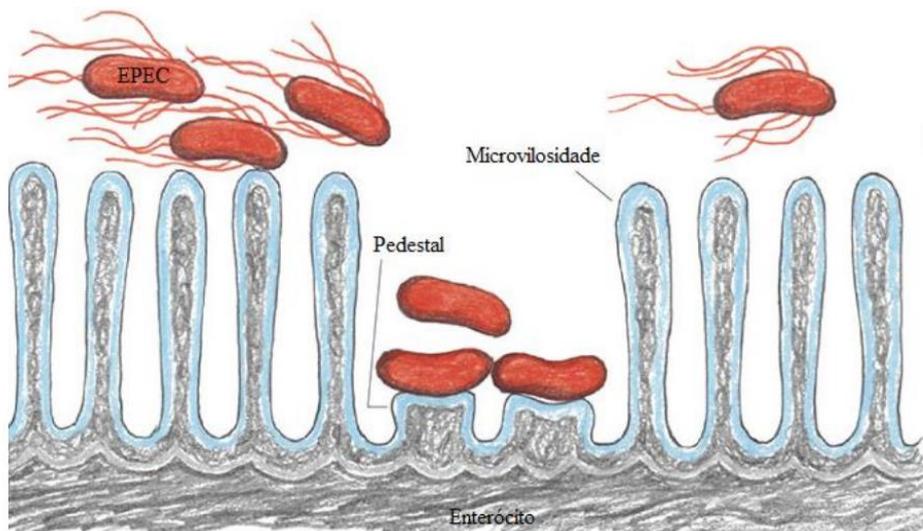


Figura 5 – Lesões *attaching/effacing* (A/E) no enterócito (Adaptado de Blum, 2014)

A identificação da *E. coli* enteropatogénica é dependente da deteção do gene *eae* – gene estrutural para a presença de intimina – cujo recetor é a proteína Tir (“Translocated intimin receptor”). A intimina liga-se a este recetor, sintetizado pela bactéria (Meng *et al.*, 2007), e torna-se, deste modo, responsável pela aderência da EPEC às células do hospedeiro (Nguyen *et al.*, 2005).

O gene *eae* apresenta, com base nas diferenças sequenciais e antigénicas, mais de dez tipos distintos de intiminas, dentre as quais a intimina α , β , ϵ e γ . A intimina que é geralmente encontrada na *E. coli* enteropatogénica é a α , enquanto as intiminas predominantes na STEC/VTEC são a ϵ e γ , sendo que a intimina γ é a mais comum de ser encontrada na *E. coli* O157:H7 (Meng *et al.*, 2007). A intimina β está presente tanto na EPEC como na STEC/VTEC. Neste trabalho, ao fazer a pesquisa deste gene, sempre que se obtiver um sinal positivo não se consegue determinar o tipo de intimina que se encontrou, visto que os primers utilizados detetam qualquer uma destas.

Este gene encontra-se descrito em normas europeias pré-estabelecidas pela Organização Internacional de Padronização (neste caso recorreu-se à norma ISO 13136:2012),

que descrevem a forma como se deve fazer a identificação de STEC/VTEC por meio de detecção dos principais genes de virulência.

As estirpes de EPEC são classificadas como típicas ou atípicas com base na presença ou ausência do plasmídeo de virulência EAF (EPEC adherence factor). Este plasmídeo codifica os *bundle-forming pilus* (BFP) que conferem aderência da bactéria aos enterócitos e são codificados pelo gene *bfpA* (Aranda *et al.*, 2004, Alikhani *et al.*, 2006 e Teixeira *et al.*, 2015).

Para se poder caracterizar uma *E. coli* como EPEC típica devem-se identificar ambos os genes referidos. No caso de não se detetar a presença do gene *bfpA* classifica-se a *E. coli* como EPEC atípica (Nguyen *et al.*, 2005).

1.3.2.4. *E. coli* enterotoxigénica

E. coli enterotoxigénica (ETEC) coloniza o hospedeiro apenas na porção inicial do intestino delgado através das fímbrias, que têm a capacidade de produzir toxinas que se podem distinguir com base na resistência térmica (Food and Drug Administration, 2012): toxina termoestável (ST) e/ou toxina termolábil (LT) (Doyle e Padhye, 1989). Estas toxinas estimulam o sistema adenilato ciclase intestinal que induz o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc – regulador celular e de transporte de iões) que leva à perda de fluídos e eletrólitos e consequente diarreia aquosa (Meng *et al.*, 2007) (Figura 6).

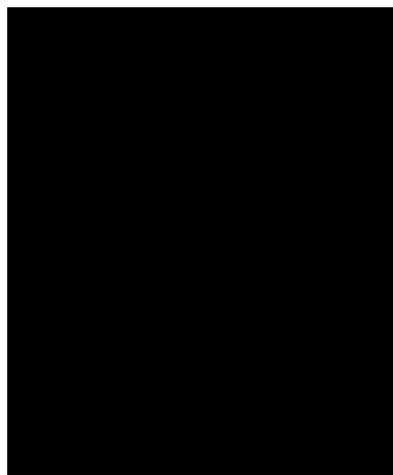


Figura 6 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de ETEC (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004)

A toxina termoestável apresenta duas variantes: STa (também designada por ST-I), produzida pela ETEC e por outras bactérias Gram-negativas como a *Yersinia enterocolitica*, e STb que é encontrada apenas na ETEC. A STa apresenta duas variantes designadas por STp (ST porcina ou STIa) e STh (ST humana ou STIb), inicialmente descobertas em estirpes isoladas de porcos ou humanos, respetivamente. Ambas as variantes podem ser encontradas em estirpes isoladas de humanos e a sua presença leva ao aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que faz com que haja a estimulação da secreção de cloreto e/ou inibição da absorção do cloreto de sódio, o que acaba por resultar em diarreia aquosa. A STb foi encontrada, primeiramente, em estirpes isoladas provenientes de porcos, no entanto, já foi também detetada em amostras de *E. coli* de origem humana. A STb, ao contrário da STa, apesar de provocar diarreia nos suínos, não apresenta qualquer manifestação clínica no humano pois não há a estimulação dos níveis de GMPc ou AMPc (Nataro e Kaper, 1998).

Para a identificação de *E. coli* enterotoxigénica podem-se detetar os genes *eltB*, gene característico da presença da toxina termolábil, e o gene *estA* que é característico da presença da toxina termoestável (Nguyen *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2014 e Nüesch-Inderbinem *et al.*, 2013). Para se poder considerar ETEC é necessária a deteção do gene *eltB* e/ou do gene *estA* (Nguyen *et al.*, 2005).

1.3.2.5. *E. coli* verotoxigénica ou produtora de Shiga toxina

O mecanismo de patogenicidade da *E. coli* verotoxigénica/produtora de Shiga toxina (VTEC/STEC) está associado à construção de pedestais e à produção da verocitotoxina (ou Shiga toxina) cuja absorção sistémica pode causar doença (Willshaw *et al.*, 2000). Stx1 e Stx2 são as duas principais toxinas da família das toxinas Shiga. Uma estirpe pode produzir Stx1, Stx2, as duas ou variantes destas toxinas, como Stx2c, Stx2e, entre outras (Nataro e Kaper, 1998) (Figura 7).

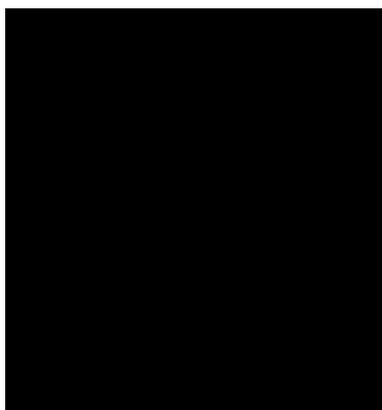


Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de patogenicidade de EHEC (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004)

Este patotipo apresenta vários serotipos diferentes, dentre os quais o serotipo O157:H7 que é considerado um dos serotipos de STEC/VTEC mais agressivos. Para além deste existem ainda os serotipos não-O157, como por exemplo, O26, O48, O91, O111, O123, O128, O141, O113:H21 (Patton e Patton, 1998 e Patton e Patton, 1999), ou o serotipo O104:H4 que já foi detetado em vegetais crus e já foi responsável por um surto de grandes dimensões na Europa em 2011 (ECDC, 2014).

Os critérios mínimos para a identificação de STEC/VTEC é a deteção do gene *stx1/vtx1* e/ou do gene *stx2/vtx2*, característicos da presença da Shiga toxina/verotoxina 1 e 2, respetivamente (Nguyen *et al.*, 2005). A deteção da presença do gene *eae* não é estritamente necessária para se poder caracterizar uma *E. coli* como STEC/VTEC, no entanto, a sua presença mostra que o isolado de STEC/VTEC apresenta maior virulência do que aqueles aos quais não foi detetado este gene. Mais recentemente, tem vindo a ser estudada a hipótese de se detetar os genes de aderência *aaiC* e *aggR* juntamente com *stx1* e/ou *stx2*, pois, tal como o gene *eae*, estes estão associados a uma maior virulência da estirpe que os apresenta (EFSA, 2013).

1.3.3. Manifestações clínicas

Os sintomas característicos da infeção por EAEC são diarreia persistente pouco volumosa com aumento da secreção de muco que, por vezes, apresenta sangue. Vômitos, febre baixa e dor abdominal são também, por vezes, sintomas associados à infeção por EAEC (Nataro e Kaper, 1998 e Willshaw *et al.*, 2000). Os sintomas surgem 8 a 18 horas após o consumo do alimento e podem durar até 14 dias (Nataro *et al.*, 1998).

A infecção por EIEC apresenta como sintomas diarreia e, por vezes, disenteria semelhante à causada por *Shigella* spp. (Nataro e Kaper, 1998 e Meng *et al.*, 2007). A diarreia inicialmente é aquosa e acompanhada de febre e cólicas abdominais, progredindo para a fase em que as bactérias penetram o colón e onde a diarreia passa a apresentar sangue e muco. No entanto, nem todas as infeções por EIEC evoluem para esta fase e por isso nem sempre é detetado sangue nas fezes (Willshaw *et al.*, 2000). Os sintomas surgem cerca de 12 a 72 horas após o consumo do alimento contaminado e podem durar, normalmente, entre 5 a 7 dias (Food and Drug Administration, 2012).

Diarreia aquosa acompanhada de vómitos e febre baixa são sintomas comuns de EPEC (Willshaw *et al.*, 2000). A diarreia gerada pela EPEC é autolimitada, no entanto, pode ocorrer enterite crónica prolongada. Os sintomas surgem muito rapidamente, cerca de 4 horas após o consumo do alimento contaminado, e podem manter-se durante 21 ou até 120 dias (Nataro e Kaper, 1998 e Food and Drug Administration, 2012).

EPEC provoca a doença vulgarmente conhecida como “diarreia do viajante” (Croxen *et al.*, 2013, Meng *et al.*, 2007 e Food and Drug Administration, 2012). Segundo Nataro e Kaper (1998) e Willshaw *et al.* (2000), a infecção por EPEC causa diarreia secretora aquosa, sem sangue nem muco, cólicas abdominais, febre e náusea, com ou sem vómitos. Os sintomas surgem cerca de 8 a 44 horas após o consumo do alimento contaminado e podem manter-se até 19 dias (Food and Drug Administration, 2012).

E. coli verotoxigénica ou produtora de Shiga toxina (VTEC/STEC) é a principal causa da colite hemorrágica e do Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH). Os sintomas da colite hemorrágica começam por dor abdominal e diarreia aquosa sem sangue e desenvolvem-se para diarreia sanguinolenta sem presença de febre. A diarreia, com ou sem sangue, pode progredir e dar origem ao SUH que podem causar diversas complicações, dentre as quais anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, que conseqüentemente pode provocar insuficiência renal progressiva, podendo levar à morte do hospedeiro infetado (Nataro e Kaper, 1998 e Willshaw *et al.*, 2000). Os sintomas surgem 1 a 9 dias após a ingestão do alimento contaminado e podem ter uma duração de até 9 dias (Nataro e Kaper, 1998 e Food and Drug Administration, 2012).

I.3.4. Tratamento

O tratamento da infecção por *E. coli* depende essencialmente de onde está localizada a infecção, do quão grave é e que tipo de *E. coli* é que está a causar doença (Bush, 2016).

O sucesso do tratamento para este tipo de infecção, na maioria dos casos, está dependente da correção precoce do desequilíbrio de fluidos e eletrólitos, ou seja, a base do tratamento da infecção para a maioria dos patótipos de *E. coli* é a hidratação, devida à perda constante e abundante de água aquando da diarreia e vômitos (Willshaw *et al.*, 2000). Em alguns casos, de forma a tentar controlar a diarreia, é administrado loperamida (fármaco obstipante) ao indivíduo doente (Bush, 2016).

Quando a diarreia é provocada pela *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), os indivíduos infetados necessitam apenas de ser hidratados e de ter os sais minerais repostos, por via intravenosa. Este tipo de infecção não é tratado com loperamida nem antibióticos. Os antibióticos podem piorar a diarreia e, conseqüentemente, aumentar o risco de se desenvolver Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH) (Bush, 2016).

À exceção da infecção causada por EHEC, todas as outras infecções causadas por outro patótipo de *E. coli*, podem ser tratadas com antibióticos, no entanto, o surgimento de bactérias multirresistentes tem limitado drasticamente o número de antibióticos que retêm a atividade contra os microrganismos patogénicos. Este problema foi ainda mais amplificado pela escassez de novas classes de antibióticos, daí a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este tipo de doença, como a terapia com peptídeos antimicrobianos e/ou combinações de dois ou mais antibióticos (Allocati *et al.*, 2013).

I.3.5. Epidemiologia

I.3.5.1. Reservatórios e Transmissão

De uma panorâmica geral, pode-se afirmar que todos os patótipos de *E. coli* abordados neste estudo são adquiridos por via fecal-oral.

E. coli enteroagregativa (EAEC) é um patótipo comum em países da América do Sul. Embora tenha sido identificada em bezerros, leitões e cavalos, os animais não são um importante reservatório de EAEC. O principal reservatório deste tipo de *E. coli* são os humanos (Croxen *et al.*, 2013).

A estirpe menos comum em países desenvolvidos é a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) que tem definido como único reservatório o Homem e apresenta uma dose infetante muito baixa compreendida entre 10 a 100 UFC. No entanto, a infeção por EIEC tem mostrado tendência a ser menos eficaz, tendo sido reportadas doses mais elevadas em estudos voluntários (Croxen *et al.*, 2013).

E. coli enteropatogénica (EPEC) possui como o único reservatório o ser humano, com crianças sintomáticas e assintomáticas e adultos assintomáticos, que são a fonte de contaminação mais provável deste patotipo. Em contraste, as estirpes atípicas foram isoladas não só de seres humanos, mas também de animais, como cães, coelhos, macacos e ovelhas (Croxen *et al.*, 2013).

A estirpe endémica na maioria dos países subdesenvolvidos é *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) que é a estirpe causadora da doença designada por “diarreia do viajante” (Meng *et al.*, 2007 e Food and Drug Administration, 2012). Este patotipo apresenta o ser humano como reservatório e a sua dose infetante deste patotipo, quando comparada com a de outros patotipos de *E. coli*, é relativamente alta e acredita-se que esteja compreendida entre 10^6 e 10^8 organismos (Croxen *et al.*, 2013).

VTEC/STEC é uma estirpe que apresenta uma dose infetante muito baixa, cerca de 500 bactérias, este patotipo é um importante causador de diarreia com sangue na Europa e as maiores taxas de incidência foram observadas em áreas rurais, na Escócia. O principal reservatório deste patotipo é animal e os alimentos mais comumente envolvidos em doenças alimentares humanas originadas pela VTEC/STEC são a carne mal cozinhada, o leite ou produtos lácteos não pasteurizados e os vegetais que são consumidos crus como alface, salsa ou espinafre, que foram, por exemplo, irrigados com água contaminada (Croxen *et al.*, 2013 e WHO, 2018).

Relativamente ao modo de transmissão desta bactéria, esta pode ser transmitida de diversas formas: através de água e alimentos contaminados (principalmente os que são consumidos crus, como por exemplo os constituintes de saladas), através de carne contaminada mal cozinhada (como hamburguers), de leite e derivados não pasteurizados (Gyles, 2007), através da má higiene por parte dos manipuladores de alimentos após a confeção dos géneros alimentícios ou durante a preparação dos mesmos devido a contaminações cruzadas que podem ocorrer devido ao contacto com superfícies ou à utilização de utensílios de cozinha contaminados (WHO, 2018) e/ou através de portadores

sintomáticos ou assintomáticos, ou seja, indivíduos que não apresentam sintomas mas que têm a capacidade de infectar outros indivíduos (Croxen *et al.*, 2013).

1.3.5.2. Incidência e surtos

O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) estima que nos EUA, no início do século XXI, a estirpe *E. coli* O157:H7 causou 73480 casos de doença e 61 mortes por ano e que as outras estirpes EHEC não-O157 são responsáveis por 37740 casos e 30 mortes, estando 85% desses casos associados ao consumo de alimentos contaminados (Ge *et al.*, 2002). Embora a taxa de mortalidade por doenças diarreicas no Mundo tenha vindo a diminuir nos últimos anos, são ainda registadas cerca de dois milhões de mortes anualmente. A maioria dos casos ocorre em crianças com menos de 5 anos de idade, residentes em países em desenvolvimento (Petri *et al.*, 2008).

Segundo a European Food Safety Authority (EFSA) e ECDC (2018), em 2017, na Europa, foram confirmados e reportados um total de 6073 casos de VTEC/STEC, sendo a maior parte desses causados pelo serotipo O157 (31,9%). Estes valores representam uma diminuição de 6,2%, relativamente ao ano de 2016. No entanto, apesar dos valores de casos de doença por este serotipo estarem a diminuir, tem-se vindo a observar um aumento da incidência de infeção por serotipos não-O157.

Em 2017, foram notificadas 20 mortes devido à infeção por VTEC/STEC, o que representa uma mortalidade de 0,5% na União Europeia (UE). O principal veículo de transmissão destes surtos, ocorridos em 2017, foi a carne bovina, seguida das frutas e vegetais (e sumos) consumidos crus. Os países da UE com maior número de casos observados foram a Irlanda, Suécia, Dinamarca, Áustria e Alemanha. Há nove países (Bulgária, Chipre, Grécia, Letónia, Lituânia, Polónia, Portugal, Roménia e Eslováquia) que reportaram 0,01 ou menos casos por cada 100.000 habitantes.

Recentemente, têm ocorrido vários surtos causados por alimentos e águas contaminadas com estirpes de *E. coli*, pertencentes aos diversos patotipos, não só em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, o que demonstra que a Segurança Alimentar está longe de ser uma meta atingida (Guerreiro, 2012). Alguns exemplos desses surtos irão ser apresentados de seguida.

Os surtos relacionados com a ingestão de alimentos frescos contaminados, como por exemplo, o causado pelo consumo de rebentos de vegetais contaminados com o serotipo O104:H4, provocou doença a mais de 2500 indivíduos, em maio de 2011, dos quais mais de

800 desenvolveram SUH e mais de 30 acabaram por morrer, na Alemanha. Mais recentemente, em março de 2016, na Roménia, foram identificados 25 casos associados ao consumo de leite contaminado, dos quais 19 desenvolveram SUH e três morreram.

Muito recentemente, foram registados dois surtos de *E. coli* nos Estados Unidos da América. Em dezembro de 2018, 17 pessoas de 8 estados diferentes, foram infetadas por *E. coli* O26. Das 17 pessoas afetadas, três necessitaram de ser hospitalizadas, no entanto, ainda não foi relatada nenhuma morte devida a este surto. Evidências epidemiológicas e laboratoriais indicaram que a farinha é uma fonte provável deste surto (ECDC *et al.*, 2019a).

Mais recentemente ainda, em março de 2019, 209 pessoas de 10 estados distintos, foram infetadas por *E. coli* O103 que foi detetada em carne picada. Das 209 pessoas afetadas, 29 foram hospitalizadas e surgiram 2 casos de SUH. Não foi registada nenhuma morte (ECDC *et al.*, 2019b).

Em Portugal, segundo uma análise realizada pelo Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o patotipo de *E. coli* que, nos anos 2002 e 2003, provocava mais infeções entéricas em Portugal era EAEC, seguida de VTEC/STEC e ETEC. A partir de 2004, as ETEC começaram a ser o patotipo mais comum, com exceção do ano 2007, em que a maioria das infeções foi provocada por EAEC e VTEC/STEC (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de casos confirmados de infeção entérica, entre 2002 e 2012, pelos principais patotipos de *E. coli* em Portugal: casos de infeções por ETEC, EPEC, STEC, EAEC e casos onde os fatores de virulência de ETEC e STEC foram detetados simultaneamente (Adaptado de Silveira *et al.*, 2013).

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Patotipos	Número de resultados positivos											Total
ETEC	5	7	27	27	24	14	25	29	8	6	11	183
EPEC	3	5	2	5	3	5	1	5	1	6	6	42
STEC	6	10	25	14	15	18	20	15	3	6	4	136
EAEC	7	16	13	16	19	19	7	7	4	6	7	121
ETEC/STEC	0	2	0	2	1	3	1	5	0	0	1	15

1.3.6. Prevenção e controlo

Apesar de, como fui referindo até aqui, estarmos ainda longe do que seria o ideal em relação à incidência desta bactéria, é relevante referir que este tipo de infeção é controlável e que na base do controlo da doença está, principalmente, o diagnóstico laboratorial rápido.

Em áreas onde a doença é endémica, o controlo da sua propagação na população é possível através do melhoramento do saneamento, particularmente pelo fornecimento de água

potável, evitando, deste modo, que ocorra contaminação da água de abastecimento com esgotos e através do controlo das moscas, que são vistas, muitas vezes, como um vetor da transmissão. As pessoas que estejam de visita a países onde as doenças causadas por *E. coli* diarrogénicas são mais comuns devem preferir consumir alimentos quentes e bem cozinhados em detrimento de alimentos crus, e bebidas quentes ou em garrafas fechadas. Devem ainda evitar adicionar gelo às bebidas pois este pode ser feito com água contaminada. Nos países desenvolvidos, onde, à partida, o saneamento é bom, é importante garantir condições de higiene adequadas em instalações públicas, como em casas de banho e parques públicos ou parques de campismo. As boas práticas de higiene na manutenção e na preparação dos alimentos, bem como a formação das pessoas que manuseiam e/ou confeccionam os alimentos (por exemplo, formações de como fazer uma correta lavagem das mãos ou as melhores técnicas que garantam a confeção e o armazenamento adequados dos alimentos), também apresentam uma elevada importância no controlo da propagação da doença (Willshaw *et al.*, 2000).

A vacinação pode ser uma importante estratégia de prevenção primária para humanos contra as estirpes mais prejudiciais, no entanto, quando o indivíduo já se encontra infetado, os antibióticos são, na maioria dos casos, essenciais para o controlo e tratamento das infeções por *E. coli* em humanos e animais (Allocati *et al.*, 2013).

Em suma, as estratégias para a prevenção e controlo da disseminação da *E. coli* devem incluir o acesso a água potável, boas práticas agrícolas, boas práticas de higiene e de fabrico dos alimentos, eficiente e eficaz saneamento básico e vacinação (Allocati *et al.*, 2013).

I.4. Técnicas de Biologia Molecular: PCR simples, PCR multiplex e eletroforese

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico rápida e sensível para a deteção dos fatores de patogenicidade de *E. coli*, sendo por isso uma opção promissora para a identificação rápida dos genes de virulência presentes em estirpes isoladas de géneros alimentícios e de ambientes de produção alimentar.

Este método, desenvolvido em 1984 pelo bioquímico americano Kary Mullis, é uma técnica comum na biologia molecular e apresenta um princípio bastante simples: um segmento de ADN (ADN-alvo) de tamanho delimitado por dois primers específicos é amplificado pela

ação de uma ADN polimerase termoestável (*Taq* polimerase) (Lourenço, 2015). Desta forma, a concentração da sequência alvo de ADN aumenta exponencialmente ao longo da PCR. Além do fragmento de ADN que se quer amplificar, do par de primers específicos (*Forward* e *Reverse*) e da *Taq* polimerase, a PCR necessita ainda dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP e dTTP, em conjunto designam-se por dNTPs), do tampão apropriado (que já contém iões magnésio (Mg^{2+}) que fazem com que a *Taq* polimerase funcione) e de água estéril para perfazer o volume da reação para a deteção de cada gene (Coleman e Tsongalis, 2006). Por vezes, para algumas reações, é necessário suplementar a reação com maior quantidade de magnésio e para isso adiciona-se cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para que os iões magnésio formem complexos solúveis com os dNTPs e com o ADN e, deste modo, a ação da *Taq* polimerase seja facilitada.

Os primers são oligonucleótidos sintéticos de ADN em cadeia simples curta (geralmente cerca de 18-22 nucleótidos) que servem para ladear a porção de ADN a ser amplificada (Joshi e Deshpande, 2011) e como ponto de partida para a síntese de ADN. São necessárias para a replicação do ADN porque a *Taq* polimerase inicia a replicação na extremidade 3' do primer e copia a cadeia oposta. Sem a presença dos primers não existiria uma cadeia de ADN onde se pudessem adicionar novos nucleótidos. Os dois primers do par devem apresentar temperaturas de emparelhamento (*annealing*) semelhantes para que a especificidade da reação seja maior, mas não devem formar dímeros consigo próprios ou entre si. A seleção dos primers é bastante importante para o rendimento da reação (Pina, 2012).

O objetivo final da PCR é amplificar as regiões de interesse para, posteriormente, visualizar a sua presença. Para que este processo possa ocorrer, a PCR tem que passar por três etapas distintas: desnaturação, emparelhamento e extensão (Joshi e Deshpande, 2011). Na primeira etapa, o ADN é desnaturado (o ADN desenrola-se e ocorre a separação da cadeia dupla, passando a existir duas cadeias simples) a altas temperaturas (entre 94°C – 96°C). Na etapa seguinte, os primers ligam-se às cadeias simples do ADN para iniciar a extensão. A temperatura a que ocorre esta etapa é de elevada importância pois se a temperatura usada não for a correta, os primers não se ligarão às cadeias simples de ADN e não poderá ocorrer a extensão. Esta temperatura é variável e específica para cada par de primers. Na última etapa, a extensão ocorre no final dos primers para criar uma cadeia de ADN complementar. Isto efetivamente duplica a quantidade de ADN através dos terceiros passos no ciclo da PCR (Joshi e Deshpande, 2011) (Figura 8).

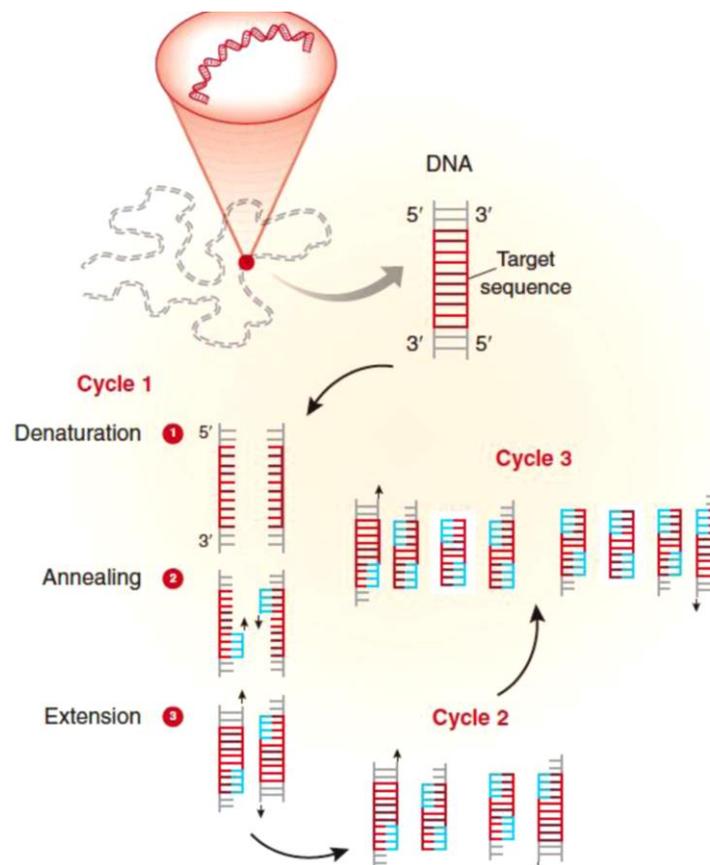


Figura 8 – Representação esquemática da PCR (Adaptado de Garibyan e Avashia, 2013)

A PCR multiplex difere da PCR simples pelo facto de ter mais do que um par de primers, cada um com uma porção de ADN-alvo diferente. Esta técnica permite a deteção em simultâneo de várias sequências genómicas alvo, desde que estas apresentem perfis térmicos iguais, como é o caso de alguns genes de virulência de *E. coli* estudados.

Ambas as técnicas de PCR apresentam diversas vantagens, nomeadamente: são técnicas que produzem resultados rapidamente e são altamente sensíveis e específicas (Garibyan e Avashia, 2013).

Apesar da PCR ser uma técnica muito valiosa também apresenta algumas limitações. Uma das principais desvantagens que se pode verificar é que os primers usados para a PCR podem-se ligar entre si formando dímeros de primers ou podem-se ligar não especificamente a sequências semelhantes, mas que não são completamente idênticas ao ADN-alvo, levando ao aparecimento de bandas inespecíficas aquando da eletroforese (Garibyan e Avashia, 2013).

A fase seguinte à realização da PCR é analisar os produtos provenientes da mesma. Existem diversos métodos para o fazer, no entanto, a escolha do método depende do tipo de informação que se pretende obter. A análise típica de produtos de PCR envolve a separação

eletroforética dos fragmentos e a visualização com GelRed ou outro corante de ADN. Na maioria dos casos, os produtos de amplificação podem ser analisados usando eletroforese em gel de agarose, pois este é capaz de separar eficazmente os produtos de ADN numa larga gama de tamanhos (entre 100pb a 25kpb) (Coleman e Tsongalis, 2006).

Durante a execução da eletroforese, as moléculas de ADN, a pH neutro, que são carregadas negativamente devido ao grupo fosfato de cada nucleótido, movem-se na direção do elétrodo positivo em resposta ao campo elétrico. Fragmentos menores migram através da matriz do gel mais rapidamente, enquanto os fragmentos maiores encontram maior resistência (Pina, 2012) (Figura 9).

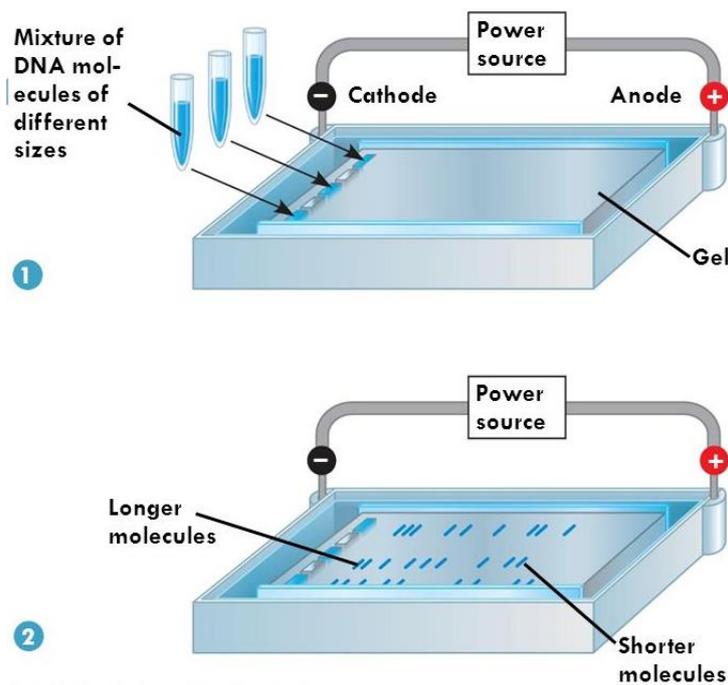


Figura 9 – Representação esquemática da eletroforese (Adaptado de <https://socratic.org/questions/why-is-gel-electrophoresis-used>)

A eletroforese em gel de agarose é o método mais fácil para visualizar e analisar os produtos da PCR. Durante a eletroforese, um conjunto predeterminado de produtos de ADN com tamanhos conhecidos (controlos positivos) é executado simultaneamente no gel com um marcador molecular que ajuda a determinar o tamanho dos fragmentos (Coleman e Tsongalis, 2006).

Capítulo II

Objetivos

2. Objetivos

Embora exista alguma bibliografia científica que mostra como se deve proceder para detetar alguns genes de virulência de *E. coli* através da PCR, este tipo de procedimento não é utilizado em rotina de laboratórios em Portugal.

O principal objetivo deste trabalho foi montar um protocolo para a deteção de fatores de virulência específicos de estirpes de *E. coli* enteropatogénicas de diversos géneros alimentícios e ambientes de produção alimentar, que possa ser usado na rotina laboratorial em laboratórios de Saúde Pública para a sua identificação, especialmente, e sempre que possível, em PCR multiplex, que se caracteriza pela sua rapidez, baixo custo e capacidade de detetar simultaneamente vários genes num só ensaio.

Posteriormente, realizou-se um estudo para avaliação da presença de fatores de patogenicidade de *E. coli* em 100 estirpes de *E. coli* β -glucuronidase positiva, oriundas do banco de estirpes do INSA, provenientes de diversos géneros alimentícios prontos a consumir e de ambientes de produção alimentar de unidades de restauração coletiva, a partir das quais foram estabelecidos objetivos específicos, nomeadamente:

Avaliar o gene de virulência mais comumente detetado nas estirpes analisadas;

Relacionar os genes encontrados com o género alimentício.

É esperado que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para a identificação rápida, através da PCR, dos diferentes patótipos de *E. coli* de forma a instituir medidas de controlo imediatas e, conseqüentemente, melhorar a Segurança Alimentar.

Capítulo III

Materiais e Metodologias

3. Metodologia

3.1. Seleção de primers

A escolha dos primers, e das suas respetivas sequências, foi efetuada através de uma revisão bibliográfica em diversos artigos científicos e numa Norma Europeia estabelecida pela Organização Internacional de Padronização (Norma ISO), para cada gene em estudo.

Os primers selecionados, a respetiva sequência, o gene alvo e as referências bibliográficas utilizadas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Primers utilizados para a deteção da presença/ausência dos fatores de patogenicidade

Patotipo	Gene alvo	Primer	Sequência do primer (5' → 3')	Referência
EAEC	<i>pCVD432</i>	EAEC1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	Aranda <i>et al.</i> (2004)
		EAEC2	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	
	<i>astA</i>	astA-F	ATGCCATCAACACAGTATAT	Boisen <i>et al.</i> (2008)
		astA-R	GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	
	<i>aggR</i>	aggR-F	GCAATCAGATTAARCAGCGATACA	Boisen <i>et al.</i> (2012)
		aggR-R	CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	
<i>aaiC</i>	aaiC-F	TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT		
	aaiC-R	GCACTCTCTTCTGGGGTAAACGA		
EIEC	<i>ipaH</i>	ipaH1	GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	Aranda <i>et al.</i> (2004)
		ipaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	
EPEC	<i>eae</i>	eae-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	ISO 13136:2012
		eae-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
	<i>bfpA</i>	EPI-F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	Aranda <i>et al.</i> (2004) e Alikhani <i>et al.</i> (2006)
		EP2-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
ETEC	<i>eltB</i>	LT-F	TCTCTATGTGCATACGGAGC	Nguyen <i>et al.</i> (2005)
		LT-R	CCATACTGATTGCCGCAAT	
	<i>estA</i>	ST-F	GCTAAACCGAGTA ^G _A GGTCTTCAAAA	
		ST-R	CCCGGTACA ^G _A GCAGGATTACAACA	
VTEC / STEC	<i>stx1</i>	stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	ISO 13136:2012
		stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
	<i>stx2</i>	stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	
		stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
	<i>eae</i>	eae-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	
		eae-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	

3.2. Estirpes bacterianas

Para auxiliar na otimização das condições foram utilizadas estirpes que serviram de controlo positivo pois são detentoras dos genes que se queriam pesquisar. Estas estirpes são, na sua maioria, de referência, pertencentes a uma coleção do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV) e apresentam a designação LMV. Para outros genes, os controlos positivos são estirpes de referência pertencentes a uma coleção americana (ATCC: do inglês “American Type Culture Collection”). As restantes estirpes que foram usadas como controlos positivos pertencem à coleção do INSA.

Na tabela abaixo (Tabela 3) estão apresentadas as estirpes usadas como controlo positivo, os genes respetivos e o tamanho de fragmento esperado.

Tabela 3 – Estirpes controlo positivo presentes no INSA utilizadas para a deteção da presença/ausência dos fatores de patogenicidade e respetivos tamanhos dos fragmentos esperados

Patotipo	Gene pesquisado	Estirpe controlo positivo	Tamanho do fragmento
EAEC	<i>pCVD432</i>	888/2004, 885/2004 e 1272 3AST	630 pb
	<i>astA</i>	D2653B, D2653-SLD, D3428I, D3431H, D3509E e D3546A	110 pb
	<i>aggR</i>	LMV_E41, HH8 (14/1) e <i>E. coli</i> HH8 (13/12)	426 pb
	<i>aaIC</i>	LMV_E41, HH8 (14/1), <i>E. coli</i> HH8 (13/12) e 417 gene <i>aggR+</i> (23/3/2018)	313 pb
EIEC	<i>ipaH</i>	LMV_E40, 5col. Shigella, Fragmento Shigella 29/8, Fragmento Shigella 6/7, 2535/1993 e ATCC 12022	600 pb
EPEC	<i>eae</i>	ATCC 35150	384 pb
	<i>bfpA</i>	LMV_E37, D3546A, F (D3546 – 21/12/12) e D3546A VTEC (12/9/16)	326 pb
ETEC	<i>eltB</i>	LMV_E39	322 pb
	<i>estA</i>	LMV_E38	147 pb
VTEC/STEC	<i>stx1</i>	ATCC 35150	180 pb
	<i>stx2</i>		255 pb
	<i>eae</i>		384 pb

Utilizou-se, ainda, a estirpe ATCC 25922 como estirpe não enteropatogénica, ou seja, é uma estirpe de *E. coli* que não apresenta nenhum dos genes que irão ser pesquisados ao longo deste trabalho.

O estudo foi efetuado a partir de ADN extraído de colónias previamente semeadas em TBX agar de 100 estirpes de *E. coli* β-glucuronidase positiva, pertencentes à coleção

bacteriana do INSA, provenientes de diversos géneros alimentícios, que se encontravam armazenadas em alíquotas a uma temperatura de -15 °C a -30 °C. Destas 100 estirpes estudadas, 41 delas referiam-se a alimentos prontos para consumo que continham hortícolas ou frutas cruas, 40 correspondiam a alimentos totalmente cozinhados e as restantes 19 estirpes foram isoladas de esfregaços com zaragatoa em superfícies de produção alimentar, pratos e talheres.

3.3. Extração de ADN

3.3.1. Otimização de condições para o processo da extração de ADN e sensibilidade do método

3.3.1.1. Obtenção de *E. coli* a partir de estirpes isoladas

O estudo foi efetuado a partir de estirpes isoladas de géneros alimentícios prontos a consumir e de superfícies de ambientes de produção alimentar em unidades de restauração coletiva. As estirpes encontravam-se conservadas em caldo de triptona de soja com 18% de glicerol e estavam congeladas a temperaturas de -15 °C a -30 °C, que posteriormente foram isoladas em TBX agar (Biokar diagnostics), que permaneceu a 44 °C ± 1 °C durante 16h-18h.

O ADN utilizado durante este trabalho foi extraído de colónias típicas que apresentavam cor azul-esverdeada, o que indicava, em TBX agar, serem colónias β-glucuronidase positivas (Figura 10). Apesar de nem todas as *E. coli* apresentarem esta cor em TBX agar, utilizaram-se as que apresentavam esta cor pois, desta forma, tinha-se a certeza que eram *E. coli*. Os sais biliares presentes neste agar inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e favorecem o crescimento de *E. coli*.

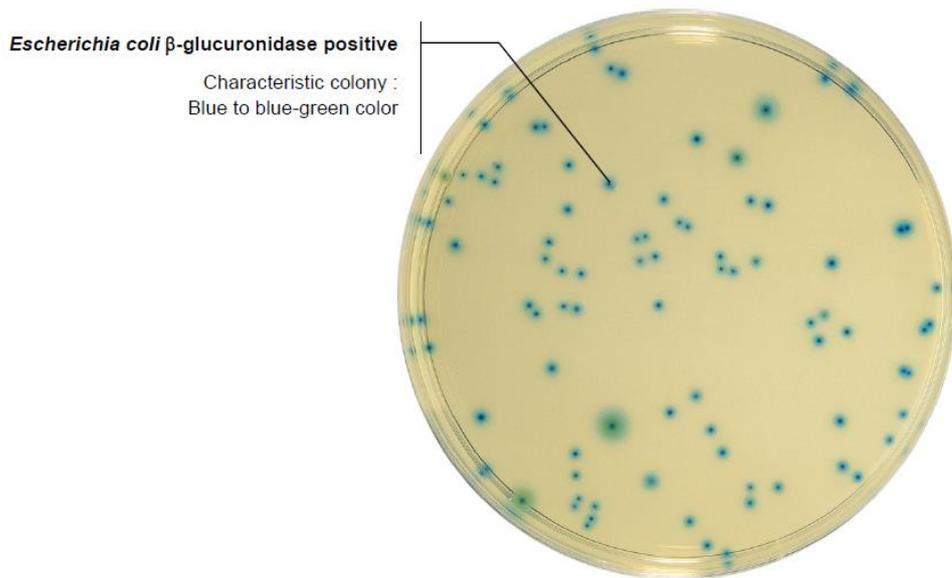


Figura 10 – Aspetto das colónias de *E. coli* β -glucuronidase positivas em TBX agar (Adaptado de Technical Data Sheet, TBX Agar, Biokar diagnostics)

O ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronato (BCIG) é um substrato cromogénico. A maioria das estirpes de *E. coli* possui a β -D-glucuronidase que cliva o BCIG, fazendo com que as colónias se tornem azul-esverdeadas de acordo com o mecanismo de reação apresentado na figura 11.

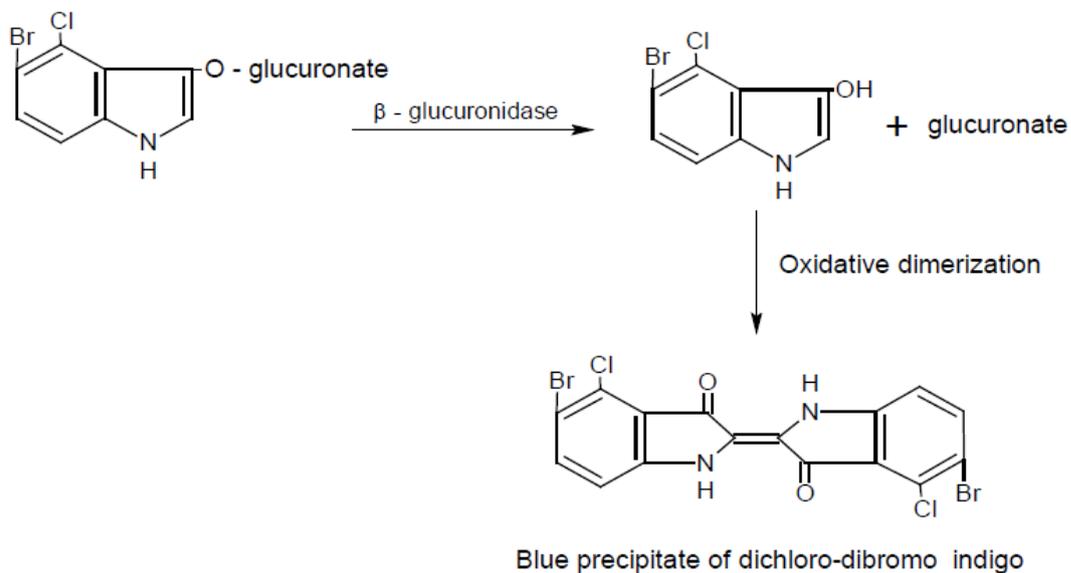


Figura 11 – Mecanismo da reação que ocorre em TBX agar (Adaptado de Technical Data Sheet, TBX Agar, Biokar diagnostics)

3.3.1.2. Extração de ADN

A norma ISO 13136:2012 estabelece as condições para a deteção dos genes característicos da VTEC/STEC e, por isso, decidiu-se utilizar a estirpe controlo positivo ATCC 35150 para otimizar as condições para a extração de ADN.

Primeiramente, começou-se por fazer a extração do ADN, pelo método de ebulição, da seguinte forma:

1. Suspendeu-se, com uma ansa de 1 μ L, num tubo *Eppendorf* estéril, 1 colónia de *E. coli* β -glucuronidase positiva (ATCC 35150) em 100 μ L de água;
2. Colocou-se os tubos em banho-maria, durante 10 minutos, a 100 °C \pm 1 °C;
3. Após a fervura, os tubos foram sujeitos a uma centrifugação de 13000rpm durante 10 minutos;
4. Colocou-se o sobrenadante, que contém o ADN, num novo tubo *Eppendorf*, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* esterilizada e conservou-se a uma temperatura de -30 °C a -15 °C.

Após a extração de ADN da estirpe controlo positivo para as VTEC/STEC, fizeram-se diluições sucessivas dessa extração de 1:10 até 1:1.000.000, ou seja, após a suspensão de 1 colónia isolada em 100 μ L de água estéril, colocou-se num novo tubo *Eppendorf* 10 μ L desse ADN extraído e adicionou-se 90 μ L de água estéril, obtendo-se desta forma a diluição 1:10, depois procedeu-se da mesma forma partindo da diluição 1:10 de forma a obter a diluição 1:100, e assim sucessivamente até à diluição 1:1.000.000. Para além das diluições efetuadas, de forma a controlar se tinham ocorrido algumas contaminações, fez-se também um branco, onde ao invés de se colocar ADN na mistura para a PCR colocou-se água estéril.

Preparou-se a mistura para a PCR, conforme descrito na tabela 4, e colocou-se no termociclador (LIFE ECO TC-96/G/H(b)C, BIOER) com o perfil térmico apresentado abaixo, na tabela 5.

Tabela 4 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção dos genes característicos de VTEC em PCR simples (ISO 13136:2012)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	15,9
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 10mM)	0,5
primer F (a 10 μM)	0,5
primer R (a 10 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,1
ADN	5,0

Tabela 5 – Perfil térmico a usar no termociclador para os genes *stx1*, *stx2* e *eae* (ISO 13136:2012)

Ciclo 1-10	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	65 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo 11-15	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	65 °C durante 120 segundos (a temperatura deve baixar 1 °C por ciclo até aos 60 °C)
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo 16-25	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	60 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo 26-35	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	60 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 150 segundos

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain, 10000X (Biotium), durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software, BIO-RAD). O marcador de peso molecular utilizado foi DNA Ladder 100bp (Biorom).

Os tamanhos esperados para as bandas amplificadas estão descritos na tabela 3 e os resultados obtidos encontram-se no Capítulo IV – Resultados e Discussão.

Em seguida, de forma a otimizar as condições para a pesquisa dos genes *eltB* e *estA* (genes de virulência de ETEC) utilizaram-se as estirpes controlo positivo presentes no banco de estirpes do INSA (LMV_E39 e LMV_E38, respetivamente), e, com base em Campos *et al.* (2015), Nguyen *et al.* (2005) e Fujioka *et al.* (2013), utilizaram-se os volumes apresentados nas

tabelas 6 e 7 para PCR duplex e PCR simples de cada um dos genes, respetivamente, e o perfil térmico apresentado na tabela 8.

Tabela 6 – Volumes utilizados na mistura para testar a deteção dos genes *eltB* e *estA* em PCR duplex (Adaptado de Campos *et al.*, 2015, Nguyen *et al.*, 2005 e Fujioka *et al.*, 2013)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	12,875
MgCl ₂	1,5
Tampão da Taq	5,0
dNTPs (a 2mM)	0,5
Primer LT-F (a 10 μM)	0,75
Primer LT-R (a 10 μM)	0,75
Primer ST-F (a 10 μM)	0,75
Primer ST-R (a 10 μM)	0,75
Taq polimerase(5U)	0,125
ADN	2,0

Tabela 7 – Volumes utilizados na mistura para testar a deteção dos genes *eltB* e *estA* em PCR simples (Adaptado de Campos *et al.*, 2015, Nguyen *et al.*, 2005 e Fujioka *et al.*, 2013)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	14,375
MgCl ₂	1,5
Tampão da Taq	5,0
dNTPs (a 2mM)	0,5
Primer F (a 10 μM)	0,75
Primer R (a 10 μM)	0,75
Taq polimerase (5U)	0,125
ADN	2,0

Tabela 8 – Perfil térmico usado para testar condições para a deteção dos genes *eltB* e *estA* (Adaptado de Campos *et al.*, 2015, Nguyen *et al.*, 2005 e Fujioka *et al.*, 2013)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
94 °C, 4 minutos	94 °C, 1 minuto	55 °C, 1 minuto	72 °C, 1 minuto	72 °C, 4 minutos
	35 ciclos			

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain, 10000X (Biotium), durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador.

O tamanho esperado para a banda característica do gene *estA* é de 147pb e para o gene *eltB* é 322pb. Os resultados obtidos encontram-se no Capítulo IV – Resultados e Discussão.

Para o estudo das 100 bactérias selecionadas para o estudo, fizeram-se 10 pools, que eram constituídas por 10 colónias de estirpes diferentes em 1mL de água estéril. A criação das pools apresenta várias vantagens, nomeadamente a redução dos custos e do tempo necessário para analisar uma quantidade de amostras maior, visto que, desta forma, com apenas 10 ensaios conseguir-se-ia realizar um *screening* de 100 estirpes.

Após alguns ensaios houve necessidade de otimizar a concentração de ADN, de forma a sistematizar o processo e diminuir fatores que pudessem inibir a PCR, como por exemplo, a existência de excessiva concentração de ADN.

Ao invés de se suspender 1 colónia isolada completa em 100µL de água estéril, suspendeu-se, num tubo *Eppendorf*, 10 “pick-ups” de 10 colónias isoladas em 100µL de água estéril. Repetiu-se este procedimento por 5 vezes, de forma a poder-se tirar conclusões com maior segurança e fizeram-se, ainda, diluições de 1:3, 1:6 e 1:10 destas extrações, de forma a perceber qual o limite de deteção deste método.

Conforme apresentado no Capítulo IV – Resultados e Discussão, percebeu-se que se poderia fazer as extrações de ADN pelo método de ebulição, anteriormente descrito, fazendo pools onde se poderia suspender até, no máximo, 10 “pick-ups” de colónias isoladas distintas em 250µL de água estéril.

3.4. Otimização de condições da PCR para os genes de virulência com estirpes controlo positivo

Após a otimização das condições para a extração de ADN, pretendia-se otimizar as condições para a realização da PCR necessária ao estudo.

3.4.1. PCR simples para cada gene

Em primeiro lugar, é necessário hidratar os primers. Os primers chegam do fornecedor liofilizados e é necessário utilizar uma quantidade de água estéril milliQ, estabelecida nos boletins de produto que vêm juntamente com os primers, para se obter a concentração stock de 100µM. Após este passo, fazem-se diluições de forma a obter-se as concentrações de trabalho para cada primer relativo a cada gene e, posteriormente, realiza-se a PCR simples para cada um dos genes com as estirpes de referência controlo positivo de forma a testar e otimizar as condições a serem utilizadas ao longo da pesquisa dos fatores de patogenicidade.

De forma a otimizar as condições para a deteção dos genes *pCVD432*, *astA*, *aaiC*, *aggR*, *ipaH*, *bfpA*, *eae*, *eltB*, *estA*, *stx1* e *stx2* utilizaram-se todas as estirpes controlo positivo presentes no banco de estirpes do INSA e apresentadas na tabela 3, e, em seguida, utilizou-se os volumes e perfil térmico apresentado, nas tabelas 9 e 10, respetivamente.

Tabela 9 – Preparação da mistura da PCR para cada gene

Genes	Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)	Referências
<i>pCVD432, astA, aaiC e aggR</i> (em PCR simples)	Água estéril	18,85	Aranda <i>et al.</i> (2004); Boisen <i>et al.</i> (2012); Adaptado de Boisen <i>et al.</i> (2012)
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 2mM)	1,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,15	
	ADN	1,0	
<i>ipaH</i>	Água estéril	18,85	Aranda <i>et al.</i> (2004)
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 2mM)	1,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,15	
	ADN	1,0	
<i>bfpA</i>	Água estéril	14,85	Aranda <i>et al.</i> (2004)
	Tampão da Taq	5,0	
	dNTPs (a 2mM)	1,5	
	Primer F (a 5 μM)	0,75	
	Primer R (a 5 μM)	0,75	
	Taq polimerase (a 5U)	0,15	
	ADN	2,0	
<i>eltB e estA</i> (em PCR simples)	Água estéril	14,375	Adaptado de Campos <i>et al.</i> (2015), Nguyen <i>et al.</i> (2005) e Fujioka <i>et al.</i> (2013)
	MgCl ₂	1,5	
	Tampão da Taq	5,0	
	dNTPs (a 2mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,75	
	Primer R (a 10 μM)	0,75	
	Taq polimerase (a 5U)	0,125	
ADN	2,0		
<i>eae</i>	Água estéril	15,9	ISO 13136:2012
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 10mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,1	
	ADN	5,0	
<i>stx1 e stx2</i>	Água estéril	14,9	ISO 13136:2012
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 10mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,1	
	ADN	5,0	

Tabela 10 – Perfis térmicos para cada PCR de cada gene, excetuando os genes característicos da VTEC/STEC

Gene	Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final	Referência
<i>pCVD432</i>	95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	58 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos	Aranda <i>et al.</i> (2004)
		40 ciclos				
<i>astA</i>	95 °C, 2 minutos	94 °C, 50 segundos	58 °C, 90 segundos	72 °C, 90 segundos	72 °C, 10 minutos	Boisen <i>et al.</i> (2012)
		35 ciclos				
<i>aaiC</i>	95 °C, 2 minutos	94 °C, 50 segundos	60 °C, 90 segundos	72 °C, 90 segundos	72 °C, 10 minutos	Adaptado de Boisen <i>et al.</i> (2012)
		35 ciclos				
<i>aggR</i>	95 °C, 2 minutos	94 °C, 50 segundos	61 °C, 90 segundos	72 °C, 90 segundos	72 °C, 10 minutos	Adaptado de Boisen <i>et al.</i> (2012)
		32 ciclos				
<i>ipaH</i>	95 °C, 5 minutos	95 °C, 45 segundos	50 °C, 1 minuto	72 °C, 1 minuto	72 °C, 7 minutos	Aranda <i>et al.</i> (2004)
		40 ciclos				
<i>bfpA</i>	95 °C, 40 segundos	95 °C, 40 segundos	58 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos	Aranda <i>et al.</i> (2004)
		40 ciclos				
<i>eltB</i> e <i>estA</i>	94 °C, 4 minutos	94 °C, 1 minuto	55 °C, 1 minuto	72 °C, 1 minuto	72 °C, 4 minutos	Adaptado de Campos <i>et al.</i> (2015), Nguyen <i>et al.</i> (2005) e Fujioka <i>et al.</i> (2013)
		35 ciclos				

Para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*, as condições são iguais e apresentam-se de forma distinta dos restantes, conforme apresentado na tabela 5.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador. O tamanho esperado para as bandas características está designado na tabela 3. Os resultados obtidos para as otimizações das condições de PCR com as estirpes controlo positivo encontram-se no Capítulo IV – Resultados e discussão.

3.4.2. Otimização de condições da PCR para os genes *aaiC* e *aggR* (genes de virulência de EAEC), *ipaH* e *bfpA* (genes de virulência de EIEC e EPEC, respetivamente)

Uma vez que não se obtiveram os resultados esperados na amplificação de alguns genes, houve necessidade de realizar novos ensaios com alterações do protocolo anteriormente descrito.

De forma a otimizar as condições para os genes *aaiC* e *aggR* (genes de virulência de EAEC), após efetuar uma nova extração de ADN das estirpes controlo positivo LMV_E4I e 417 gene *aggR+* (23/3/2018), fez-se um gradiente crescente de temperatura para a temperatura de emparelhamento. O perfil térmico usado para estes genes foi o apresentado na tabela 11.

Tabela 11 – Perfil térmico usado para otimizar condições para a deteção dos genes *aaiC* e *aggR* (Adaptado de Boisen *et al.*, 2012)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 2 minutos	94 °C, 50 segundos	58 °C-65 °C, 90 segundos	72 °C, 90 segundos	72 °C, 10 minutos
	35 ciclos			

Relativamente ao gene *ipaH* (gene de virulência da EIEC), decidiu-se adaptar os volumes a usar na mistura da PCR, que eram sugeridos por Aranda *et al.* (2004), conforme apresentado nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a deteção do gene *ipaH* (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	16,18
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 2mM)	3,12
Primer <i>ipaH1</i> (a 10 μM)	0,5
Primer <i>ipaH2</i> (a 10 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,2
ADN	2,0

Tabela 13 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene *ipaH* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	15,68
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 2mM)	3,12
Primer ipaH1 (a 10 μM)	0,5
Primer ipaH2 (a 10 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,2
ADN	2,5

Relativamente ao gene *bfpA* (gene de virulência de EPEC), fizeram-se gradientes de temperatura com a temperatura de emparelhamento entre 50 °C e 65 °C com algumas das misturas apresentadas e adaptou-se, ainda, os volumes a usar na mistura da PCR, que eram sugeridos por Aranda et al. (2004), da seguinte forma:

Tabela 14 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	18,85
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 2mM)	1,5
Primer bfpA-F (a 2 μM)	0,5
Primer bfpA-R (a 2 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,15
ADN	1,0

Tabela 15 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	17,35
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 2mM)	1,5
Primer bfpA-F (a 2 μM)	0,5
Primer bfpA-R (a 2 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,15
ADN	2,5

Em algumas adaptações ao sugerido pela bibliografia, decidiu-se adicionar iões Mg^{2+} , através da adição de MgCl_2 , nos componentes da mistura para a PCR, como apresentado nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene *bfpA*, com adição de íões Mg^{2+} (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	16,6
Tampão da Taq	2,5
$MgCl_2$	0,75
dNTPs (a 2mM)	1,5
Primer <i>bfpA</i> -F (a 5 μM)	0,5
Primer <i>bfpA</i> -R (a 5 μM)	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,15
ADN	2,5

Tabela 17 – Volumes utilizados na mistura da PCR para otimizar a detecção do gene *bfpA*, com adição de íões Mg^{2+} (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	18,1	17,1
Tampão da Taq	2,5	2,5
$MgCl_2$	0,75	0,75
dNTPs (a 2mM)	1,5	1,5
Primer <i>bfpA</i> -F (a 5 μM)	0,5	0,5
Primer <i>bfpA</i> -R (a 5 μM)	0,5	0,5
Taq polimerase (a 5U)	0,15	0,15
ADN	1,0	2,0

Para a otimização da PCR para a detecção do *bfpA* (gene de virulência de EPEC), utilizou-se, ainda, diversa bibliografia, que foi escolhida com base na sequência de nucleótidos dos primers, nomeadamente Mohammadeh *et al.* (2017) (tabelas 18 e 19), Alikhani *et al.* (2006) (tabela 20 e 21), Huasai *et al.* (2012) (tabela 22 e 23) e Li *et al.* (2012) (tabela 24 e 25).

As misturas para a PCR e os perfis térmicos utilizados foram os seguintes:

Tabela 18 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene *bfpA* (Mohammadeh *et al.*, 2017)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	9,0
MasterMix (2x)	12,0
Primer <i>bfpA</i> -F (a 20 μM)	1,0
Primer <i>bfpA</i> -R (a 20 μM)	1,0
ADN	2,0

Tabela 19 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Mohammadeh *et al.*, 2017)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 �C, 5 minutos	95 �C, 30 segundos	62 �C, 30 segundos	72 �C, 30 segundos	72 �C, 5 minutos
	30 ciclos			

Tabela 20 – Volumes utilizados na mistura para testar a detec o do gene *bfpA* (Alikhani *et al.*, 2006)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em �L ($V_{total} = 25\mu L$)
�gua estéril	15,8
Tampão da Taq	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTPs (a 10mM)	1,0
Primer <i>bfpA</i> -F (a 5�M)	1,0
Primer <i>bfpA</i> -R (a 5�M)	1,0
Taq polimerase (a 5U)	0,2
ADN	2,0

Tabela 21 – Perfil t rmico usado para testar condiç es para a detec o do gene *bfpA* (Alikhani *et al.*, 2006)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 �C, 5 minutos	95 �C, 1 minuto	50 �C-60 �C, 1 minuto	72 �C, 1 minuto	72 �C, 7 minutos
	35 ciclos			

Tabela 22 – Volumes utilizados na mistura para testar a detec o do gene *bfpA* (Huasai *et al.*, 2012)

Componentes da mix	Volumes para uma reação, em �L ($V_{total} = 25\mu L$)
�gua estéril	14,25
Tampão da Taq	2,0
MgCl ₂	4,0
dNTPs (a 10mM)	0,5
Primer <i>bfpA</i> -F (a 5�M)	1,0
Primer <i>bfpA</i> -R (a 5�M)	1,0
Taq polimerase (a 5U)	0,25
ADN	2,0

Tabela 23 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Huasai et al., 2012)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
94 °C, 1 minuto	94 °C, 30 segundos	55 °C-60 °C, 30 segundos	72 °C, 1 minuto	72 °C, 10 minutos
	30 ciclos			

Tabela 24 – Volumes utilizados na mistura para testar a detecção do gene *bfpA* (Li et al., 2012)

Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)
Água estéril	15,3
Tampão da Taq	2,5
dNTPs (a 10mM)	2,0
Primer <i>bfpA</i> -F (a 5 μM)	1,0
Primer <i>bfpA</i> -R (a 5 μM)	1,0
Taq polimerase (a 5U)	0,2
ADN	3,0

Tabela 25 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Li et al., 2012)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
94 °C, 5 minutos	94 °C, 30 segundos	50 °C-58 °C, 30 segundos	72 °C, 1 minuto	72 °C, 10 minutos
	35 ciclos			

3.4.3. PCR das amostras

Após a otimização das condições para a PCR para cada gene com as estirpes controlo positivo, fizeram-se 10 pools de 10 estirpes diferentes cada e o produto obtido pela PCR foi analisado através da eletroforese com gel de agarose a 2% e visualizado sob luz UV num transiluminador. Caso alguma pool apresentasse sinal positivo, a pool seria analisada de forma mais pormenorizada e extrair-se-ia o ADN de cada estirpe de forma individual, onde se suspenderia 1 “pick-up” de uma estirpe em 250 μL de água estéril e procedia-se à PCR com os mesmos volumes da mistura e o mesmo perfil térmico utilizado para a análise das pools para esse gene. O tamanho esperado para as bandas características está descrito na tabela 3. Os resultados da análise às 100 estirpes de *E. coli* β -glucuronidase positiva são apresentados no Capítulo IV.

3.5. Sequenciação dos produtos da PCR

Após a realização da PCR de amplificação e de se verificar através da eletroforese que existiam bandas coincidentes com as amplificadas nos controlos positivos, fez-se a purificação do produto da PCR onde se utilizou 2 μ L de produto para cada sentido da amplificação (forward e reverse) com 1 μ L de enzima (Exo ProStar).

Homogeneizou-se e colocou-se no termociclador com o seguinte perfil térmico:

- 1) 15 minutos a 37 °C;
- 2) 15 minutos a 80 °C.

Após a purificação do produto da PCR preparou-se o mesmo para um PCR de sequenciação em que, para cada reação, onde se pretende ter um volume final de 10 μ L, utilizou-se os 3 μ L de produto purificado com 0,5 μ L de primer (forward ou reverse), 0,5 μ L de Tampão 5x, 0,5 μ L de MasterMix (denominada Big Dye) e 5,5 μ L de água.

Homogeneizou-se e colocou-se no termociclador com o perfil térmico apresentado na tabela 26:

Tabela 26 – Perfil térmico para a PCR de sequenciação

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão
94 °C, 2 minutos	94 °C, 10 segundos	50 °C, 6 segundos	60 °C, 4 minutos
	25 ciclos		

Após a realização deste procedimento, enviaram-se os produtos para a Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa, para se proceder à sequenciação.

Com a sequenciação obtiveram-se sequências de nucleótidos para as estirpes suspeitas que foram colocadas numa ferramenta *online* básica de pesquisa de alinhamento local (em inglês: Basic Local Alignment Search Tool – BLAST). O BLAST é um programa do NCBI (do inglês: National Center for Biotechnology Information) que compara sequências de nucleótidos ou de proteínas com bancos de dados de sequências e determina a similaridade entre as mesmas.

Os resultados obtidos na sequenciação dos produtos da PCR encontram-se descritos no Capítulo IV – Resultados e discussão.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4. Resultados

4.1. Otimização de condições para a extração de ADN e sensibilidade do método

4.1.1. Com estirpes controlo positivo

Os resultados obtidos aquando das PCR simples para os genes característicos da VTEC/STEC com a estirpe ATCC 35150 de forma a, para além de testar as condições para estes genes, estabelecer um limite de deteção do método utilizado, encontram-se apresentados nas figuras 12, 13 e 14.

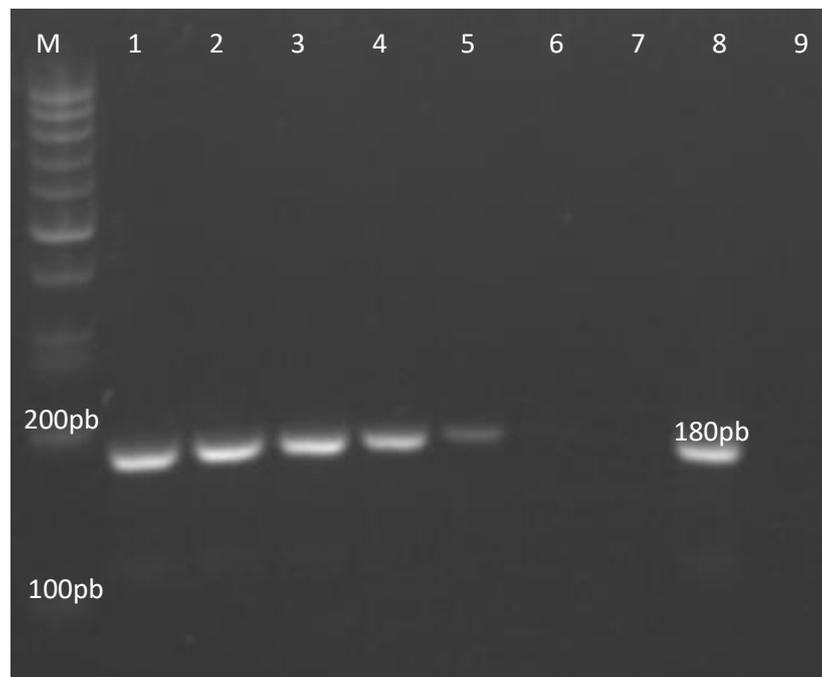


Figura 12 – Amplificação por PCR, para o gene *stx1*, de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – Solução-mãe: ADN extraído por fervura de 1 colónia típica (ATCC 35150) em 100 µL de água, 2 – Diluição 1:10 da solução-mãe, 3 – Diluição 1:100 da solução-mãe, 4 – Diluição 1:1000 da solução-mãe, 5 – Diluição 1:10000 da solução-mãe, 6 – Diluição 1:100000 da solução-mãe, 7 – Diluição 1:1000000 da solução-mãe, 8 – Controlo positivo (ATCC 35150), 9 – Branco (água estéril)

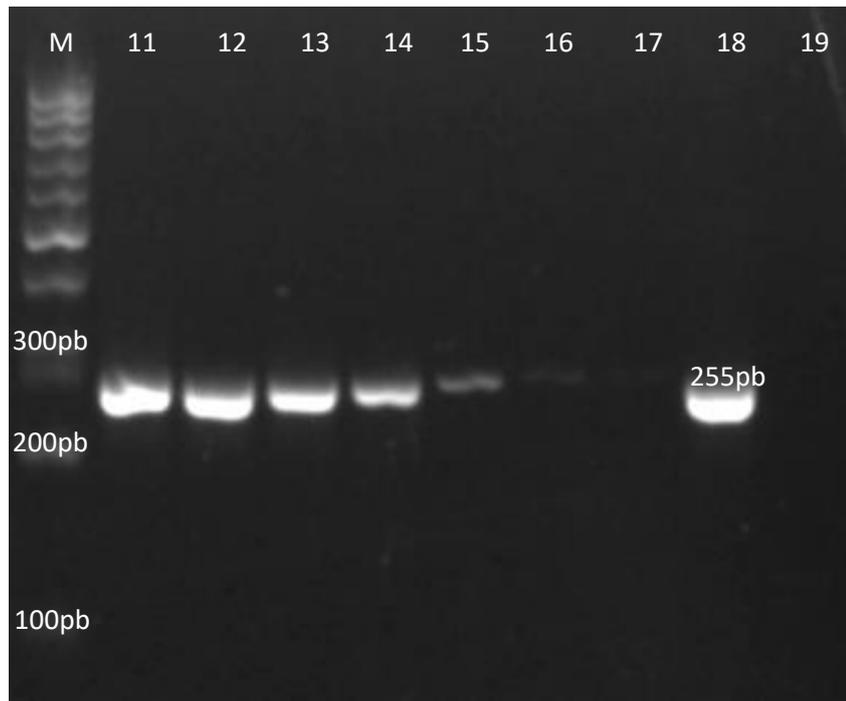


Figura 13 – Amplificação por PCR, para o gene *stx2*, de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 11 – Solução-mãe: ADN extraído por fervura de 1 colónia típica (ATCC 35150) em 100 µL de água, 12 – Diluição 1:10 da solução-mãe, 13 – Diluição 1:100 da solução-mãe, 14 – Diluição 1:1000 da solução-mãe, 15 – Diluição 1:10000 da solução-mãe, 16 – Diluição 1:100000 da solução-mãe, 17 – Diluição 1:1000000 da solução-mãe, 18 – Controlo positivo (ATCC 35150), 19 – Branco (água estéril)

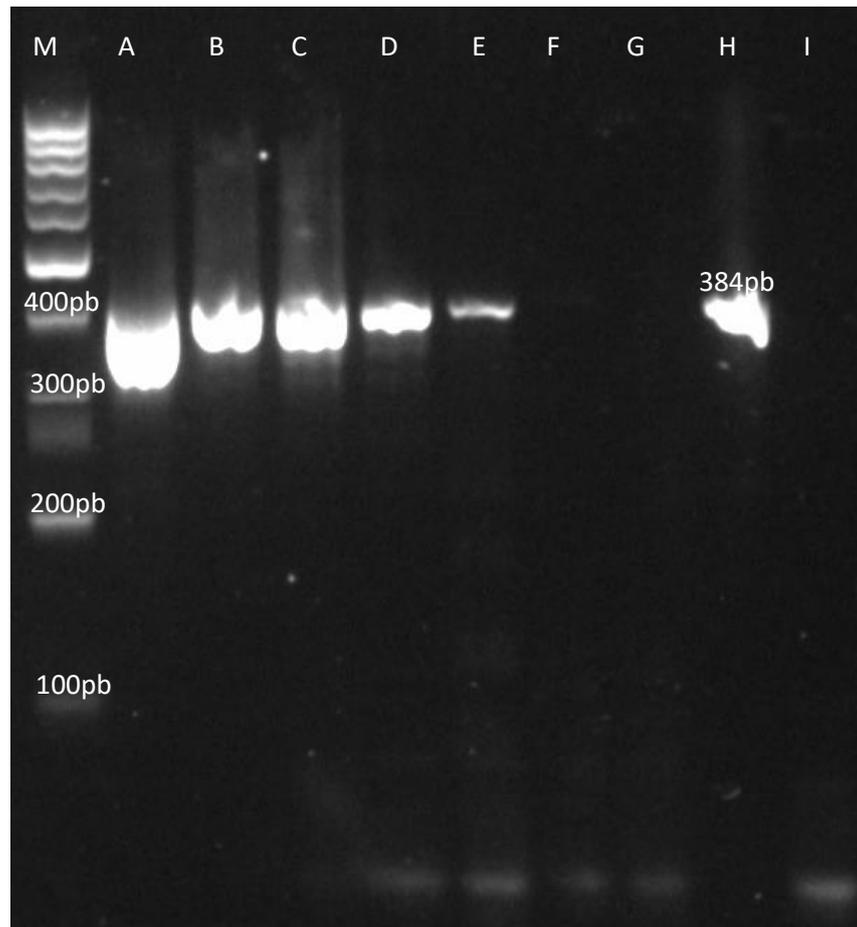


Figura 14 – Amplificação por PCR, para o gene *eae*, de ADN extraído por fervura de uma colónia de ATCC 35150 em 100µL de água

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), A – Solução-mãe: ADN extraído por fervura de 1 colónia típica (ATCC 35150) em 100 µL de água, B – Diluição 1:10 da solução-mãe, C – Diluição 1:100 da solução-mãe, D – Diluição 1:1000 da solução-mãe, E – Diluição 1:10000 da solução-mãe, F – Diluição 1:100000 da solução-mãe, G – Diluição 1:1000000 da solução-mãe, H – Controlo positivo (ATCC 35150), I – Branco (água estéril)

Com estes resultados pode-se concluir que as condições estabelecidas estavam bem definidas para estes genes, pois obtinha-se a banda esperada no peso molecular pretendido e que a extração de ADN poderia ser realizada em maiores volumes de água estéril visto que a diluição 1:10000 apresentava, ainda, uma banda visível, ou seja, o método era sensível.

Os resultados obtidos aquando da otimização das condições, em PCR simples e duplex, para os genes característicos da ETEC, são apresentados na figura 15.

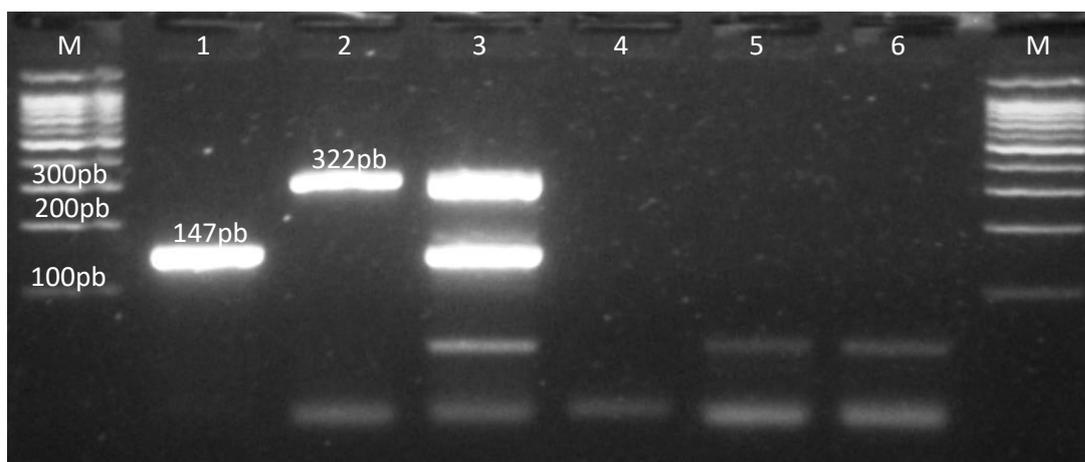


Figura 15 – Teste das condições para a otimização da amplificação por PCR, para os genes *eltB* e *estA*, para testar condições para a otimização

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E38 (gene *estA*), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E39 (gene *eltB*), 3 – Duplex (estirpes referência LMV_E38 e LMV_E39), 4 – Branco da referência LMV_E38 (água), 5 – Branco da referência LMV_E39 (água), 6 – Branco do duplex (água estéril)

Perante os resultados obtidos, decidiu-se utilizar, com as condições apresentadas, a estirpe LMV_E38 como controlo positivo para o gene *estA* e a estirpe LMV_E39 como controlo positivo para o gene *eltB* pois com estas obtinham-se bandas bem definidas, assim como se conseguiu obter bandas distintas no PCR duplex.

4.1.2. Teste da PCR duplex em estirpes amostra para os genes *estA* e *eltB* característicos do patotipo ETEC

Em seguida, fizeram-se 10 pools, que eram constituídas por 10 colónias de estirpes diferentes em 1mL de água estéril. A criação das pools apresenta várias vantagens, nomeadamente a redução dos custos e do tempo necessário para analisar uma quantidade de amostras maior, visto que, desta forma, com apenas 10 ensaios conseguir-se-ia analisar as 100 estirpes.

De forma a analisar as pools para a presença ou ausência dos genes característicos da ETEC, realizou-se uma PCR duplex, conforme descrito nas tabelas 6 e 8, no Capítulo III. Os resultados obtidos da PCR duplex, após eletroforese em gel de agarose foram os apresentados na figura 16.

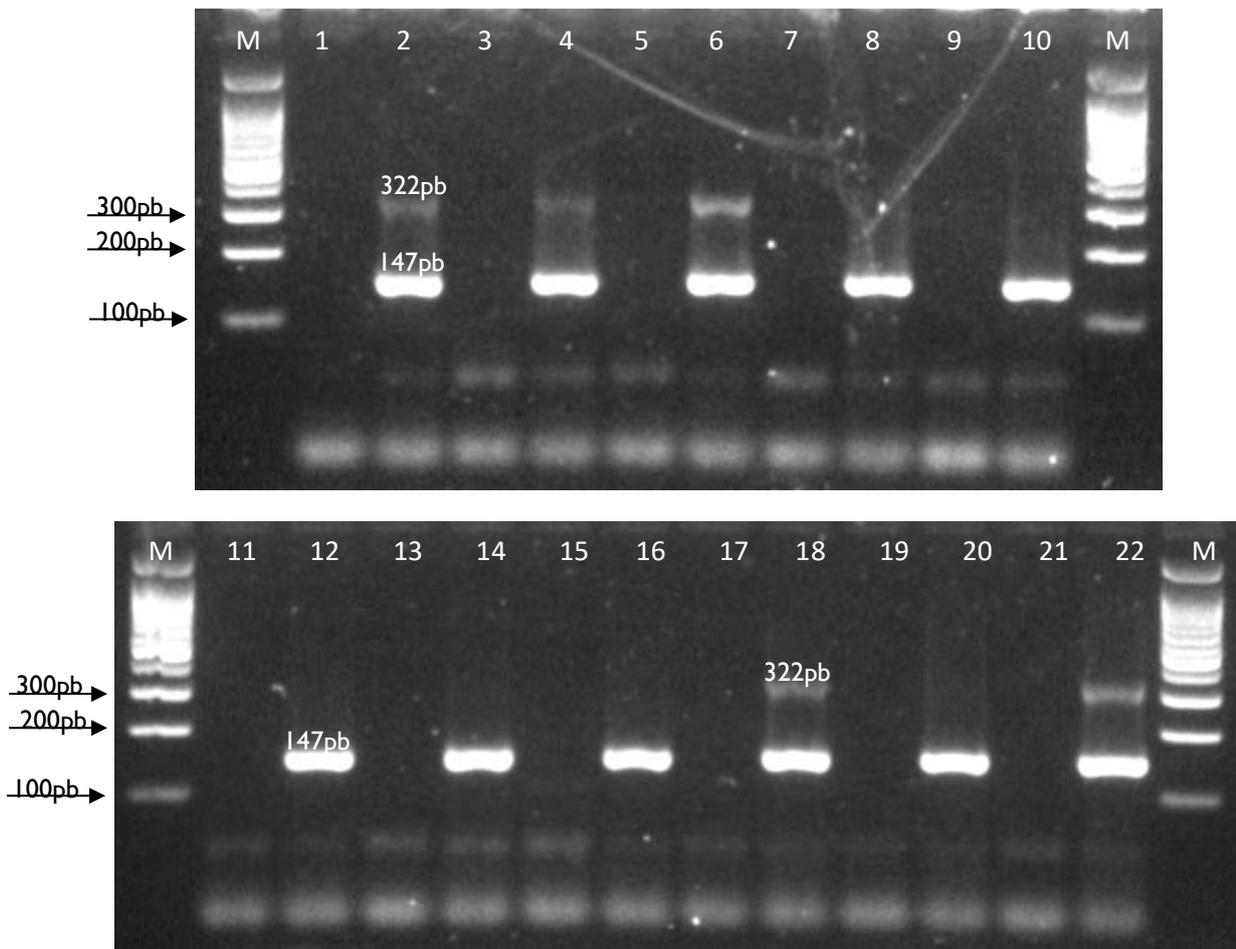


Figura 16 – Amplificação por PCR, para os genes *eltB* e *estA*, em duplex, de ADN extraído por fervura de estirpes isoladas de alimentos, a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – Pool A (composta por 10 colónias de estirpes distintas em 250µL de água), 2 – Controlo interno de Pool A (1µL de amostra + 0,5µL de cada controlo positivo), 3 – Pool B, 4 – Controlo interno de Pool B, 5 – Pool C, 6 – Controlo interno de Pool C, 7 – Pool D, 8 – Controlo interno de Pool D, 9 – Pool E, 10 – Controlo interno de Pool E, 11 – Pool F, 12 – Controlo interno de Pool F, 13 – Pool G, 14 – Controlo interno de Pool G, 15 – Pool H, 16 – Controlo interno de Pool H, 17 – Pool I, 18 – Controlo interno de Pool I, 19 – Pool J, 20 – Controlo interno de Pool J, 21 – Branco (água estéril), 22 – Controlo positivo (LMV_E38 + LMV_E39)

Após a análise dos resultados verificou-se que não seria possível fazer-se a deteção destes genes em PCR duplex pois os primers, quando em conjunto com as estirpes controlo positivo e os diversos ADN constituintes de cada pool, mostraram maior predileção para o gene *estA*, algo que não aconteceu quando se testou as estirpes controlo positivo. Tal poderá ter ocorrido devido a alguma interação dos primers com o ADN, por existir uma maior quantidade e diversidade de ADN, que não existia quando se testou as estirpes controlo positivo.

Ao fazer-se a pesquisa destes genes em PCR simples, para além do ADN da pool constituído pelas 10 colónias em 1mL de água, realizou-se o ensaio de controlo positivo desde

a extração da pool adicionando-se 1 colônia isolada da estirpe controlo positivo às estirpes suspensas nos 250µL de água estéril e, de seguida, o ADN foi extraído. Realizou-se, ainda, um segundo controlo positivo, ao qual se designou por controlo interno, em que a PCR foi efetuada com uma mistura, em volumes iguais de ADN extraído da pool e ADN extraído de uma estirpe controlo positivo. Todos estes controlos serviram como garantia do controlo da qualidade do processo.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os apresentados nas figuras 17 e 18.

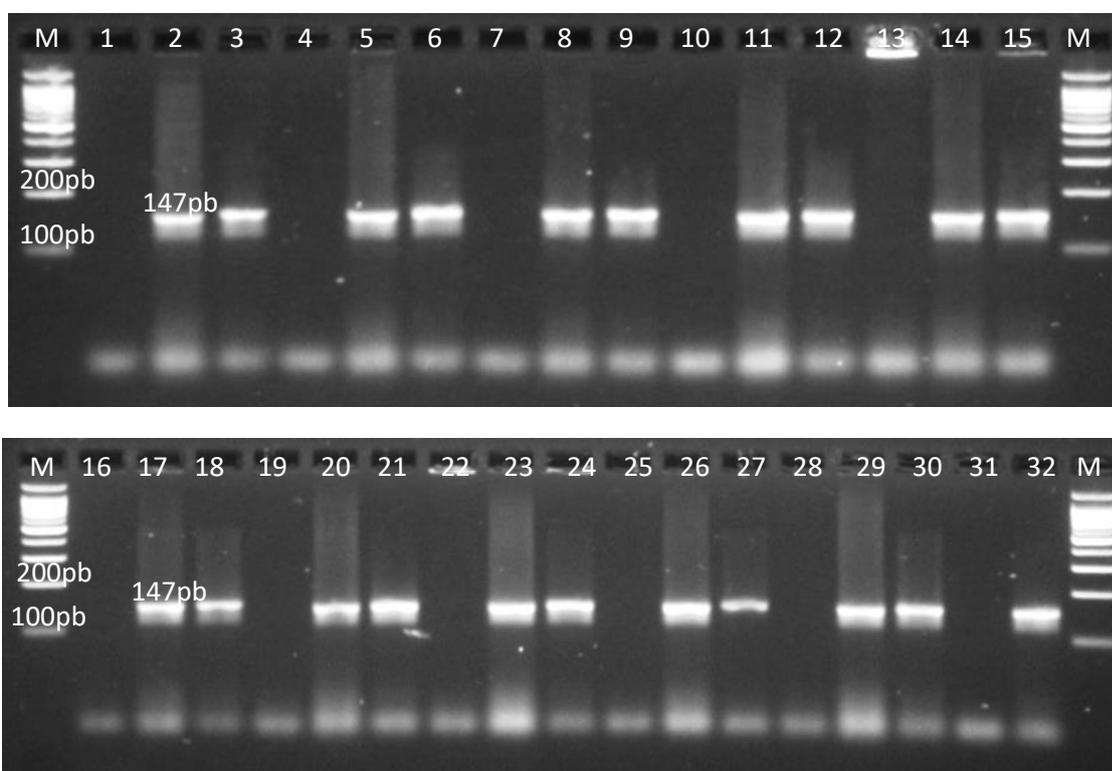


Figura 17 – Amplificação por PCR, para os genes *estA*, de ADN extraído por fervura, a partir a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – Pool A (composta por 1 colônia de cada estirpe até perfazer 10 colônias em 250µL de água), 2 – Pool A com estirpe controlo positivo, 3 – Controlo interno de Pool A (1µL de Pool A + 1µL de controlo positivo), 4 – Pool B, 5 – Pool B com estirpe controlo positivo, 6 – Controlo interno de Pool B, 7 – Pool C, 8 – Pool C com estirpe controlo positivo, 9 – Controlo interno de Pool C, 10 – Pool D, 11 – Pool D com estirpe controlo positivo, 12 – Controlo interno de Pool D, 13 – Pool E, 14 – Pool E com estirpe controlo positivo, 15 – Controlo interno de Pool E, 16 – Pool F, 17 – Pool F com estirpe controlo positivo, 18 – Controlo interno de Pool F, 19 – Pool G, 20 – Pool G com estirpe controlo positivo, 21 – Controlo interno de Pool G, 22 – Pool H, 23 – Pool H com estirpe controlo positivo, 24 – Controlo interno de Pool H, 25 – Pool I, 26 – Pool I com estirpe controlo positivo, 27 – Controlo interno de Pool I, 28 – Pool J, 29 – Pool J com estirpe controlo positivo, 30 – Controlo interno de Pool J, 31 – Branco (água estéril), 32 – Controlo positivo (LMV_E38)

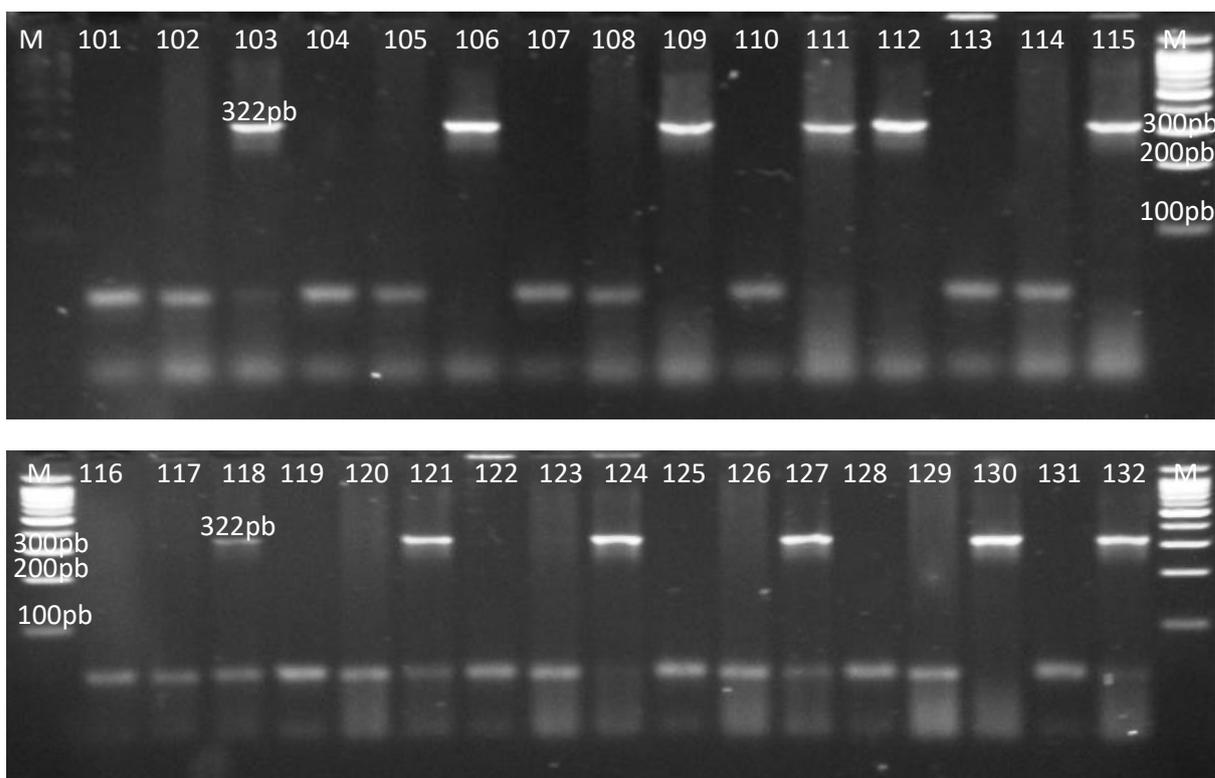


Figura 18 – Amplificação por PCR, para os genes *eltB*, de ADN extraído por fervura, a partir a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 101 – Pool A (composta por 1 colónia de cada estirpe até perfazer 10 colónias em 250µL de água), 102 – Pool A com estirpe controlo positivo, 103 – Controlo interno de Pool A (1µL de Pool A + 1µL de controlo positivo), 104 – Pool B, 105 – Pool B com estirpe controlo positivo, 106 – Controlo interno de Pool B, 107 – Pool C, 108 – Pool C com estirpe controlo positivo, 109 – Controlo interno de Pool C, 110 – Pool D, 111 – Pool D com estirpe controlo positivo, 112 – Controlo interno de Pool D, 113 – Pool E, 114 – Pool E com estirpe controlo positivo, 115 – Controlo interno de Pool E, 116 – Pool F, 117 – Pool F com estirpe controlo positivo, 118 – Controlo interno de Pool F, 119 – Pool G, 120 – Pool G com estirpe controlo positivo, 121 – Controlo interno de Pool G, 122 – Pool H, 123 – Pool H com estirpe controlo positivo, 124 – Controlo interno de Pool H, 125 – Pool I, 126 – Pool I com estirpe controlo positivo, 127 – Controlo interno de Pool I, 128 – Pool J, 129 – Pool J com estirpe controlo positivo, 130 – Controlo interno de Pool J, 131 – Branco (água estéril), 132 – Controlo positivo (LMV_E39)

Após a análise dos géis obtidos verificou-se que no ensaio haviam resultados falsos negativos pois nem todas as amostras que continham ADN das estirpes controlo positivo amplificavam a banda desejada e começou-se a colocar a hipótese de se estar a adicionar ADN a mais, pois todas as amostras que continham menor quantidade de ADN (1µL de Pool com 1µL de controlo positivo ao invés de 2µL de Pool) tinham amplificado a banda desejada. Realizaram-se novos ensaios otimizando a quantidade de ADN retirada de cada estirpe, dado que ao retirar uma colónia, devido à sua diversidade relativamente ao tamanho da mesma, havia uma diversidade muito grande de concentração de ADN extraído. Ao invés de se suspender 1 colónia isolada em 100µL de água estéril, poder-se-ia suspender até, no máximo, 10 “pick-ups” de colónias isoladas no mesmo volume de água estéril. Repetiu-se este procedimento por 5 vezes, de forma a poder-se tirar conclusões com maior segurança e

verificar se haveria reprodutibilidade e fizeram-se, ainda, diluições de 1:3, 1:6 e 1:10 destas extrações, de forma a perceber qual o limite de detecção deste método.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os apresentados na figura 19.

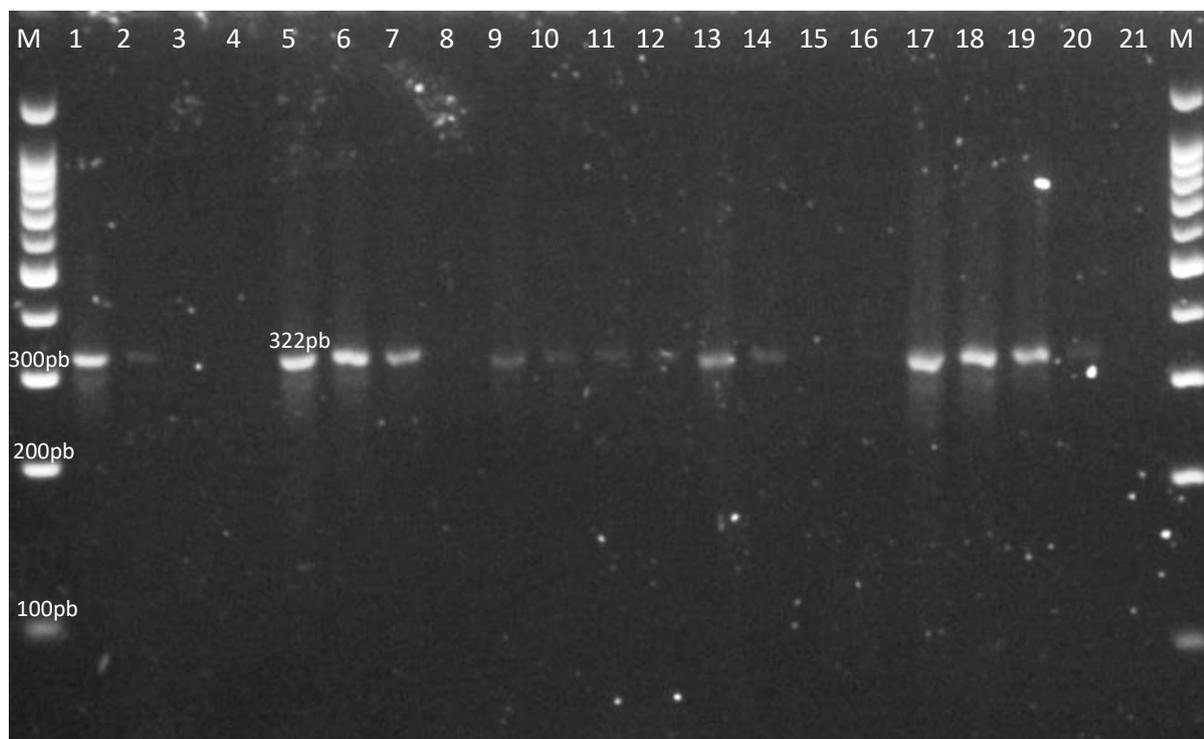


Figura 19 – Amplificação por PCR, para o gene *eltB*, de ADN extraído por fervura de 10 “pick-up” de colónias de LMV_E39 em 100µL de água e diluições

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura de 10 “pick-ups” da referência LMV_E39 em 100µL de água, 2 – Diluição 1:3 de (1), 3 – Diluição 1:6 de (1), 4 – Diluição 1:10 de (1), 5 – ADN extraído por fervura de 10 “pick-ups” da referência LMV_E39 em 100µL de água, 6 – Diluição 1:3 de (5), 7 – Diluição 1:6 de (5), 8 – Diluição 1:10 de (5), 9 – ADN extraído por fervura de 10 “pick-ups” da referência LMV_E39 em 100µL de água, 10 – Diluição 1:3 de (9), 11 – Diluição 1:6 de (9), 12 – Diluição 1:10 de (9), 13 – ADN extraído por fervura de 10 “pick-ups” da referência LMV_E39 em 100µL de água, 14 – Diluição 1:3 de (13), 15 – Diluição 1:6 de (13), 16 – Diluição 1:10 de (13), 17 – ADN extraído por fervura de 10 “pick-ups” da referência LMV_E39 em 100µL de água, 18 – Diluição 1:3 de (17), 19 – Diluição 1:6 de (17), 20 – Diluição 1:10 de (17), 21 – Branco (água estéril)

Deste modo, com estes resultados pôde-se concluir que se devem fazer as extrações de ADN das pools com “pick-ups” de colónias em 300µL de água, no entanto, como algumas das bandas obtidas na diluição de 1:3, são muito fracas, decidiu-se fazer a extração de ADN de, no máximo, 10 “pick-ups” em 250µL de água. A utilização de um maior volume (250µL) facilitaria a utilização da mesma extração de ADN para a realização de vários ensaios de PCR.

4.2. Otimização das condições da PCR para os genes de virulência com estirpes controlo positivo

Relativamente aos genes *pCVD432* e *astA*, os resultados obtidos com as condições apresentadas nas tabelas 9 e 10 (Capítulo III – Materiais e Metodologias) são os apresentados nas figuras 20 e 21.

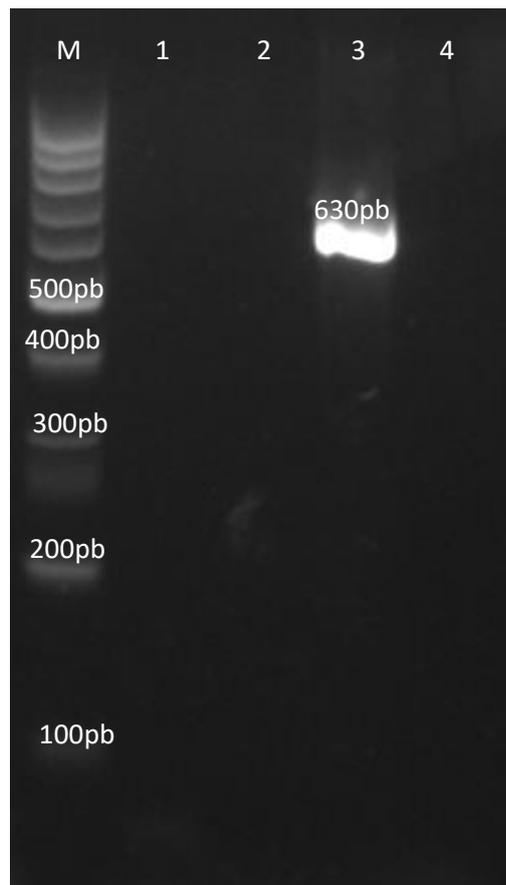


Figura 20 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *pCVD432*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência 888/2004, 2 – ADN extraído por fervura da referência 885/2004, 3 – ADN extraído por fervura da referência 1272/3AST, 4 – Branco (água estéril)

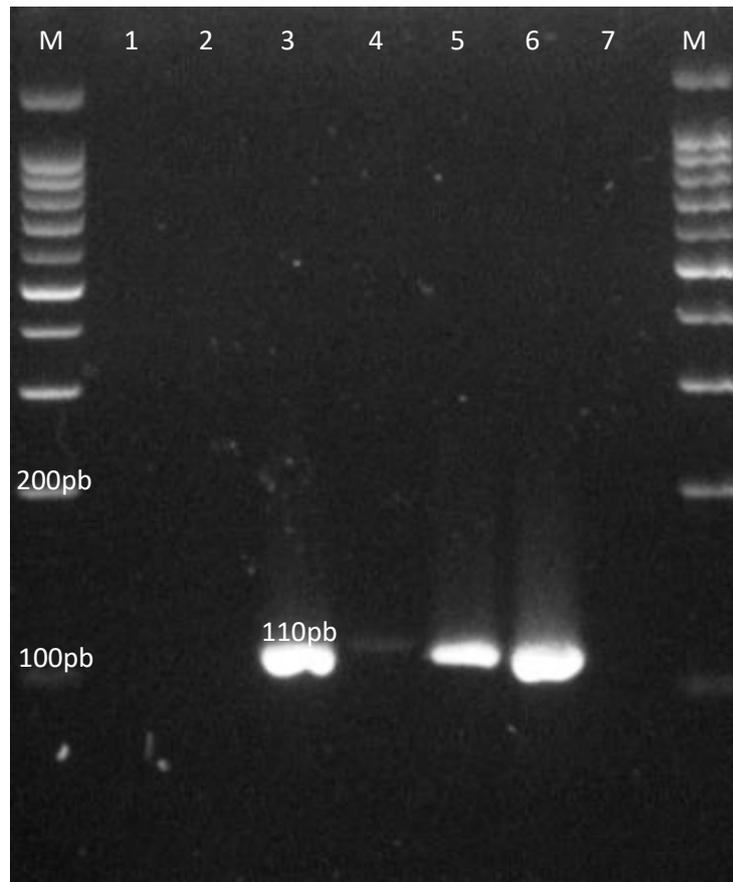


Figura 21 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *astA*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência D2653B, 2 – ADN extraído por fervura da referência D2653-SLD, 3 – ADN extraído por fervura da referência D3428I, 4 – ADN extraído por fervura da referência D343IH, 5 – ADN extraído por fervura da referência D3509E, 6 – ADN extraído por fervura da referência D3546A, 7 – Branco (água estéril)

Após a análise do gel concluiu-se que se deve usar a estirpe controlo positivo 1272 3AST para o gene *pCVD432* e a estirpe D3509E como controlo positivo para o gene *astA*, visto ser aquele com que se consegue amplificar uma banda mais bem definida.

Em relação aos restantes genes característicos da EAEC, *aiiC* e *aggR*, os resultados primeiramente obtidos com as condições apresentadas nas tabelas 9 e 10 (Capítulo III – Materiais e Metodologias) são os seguintes:

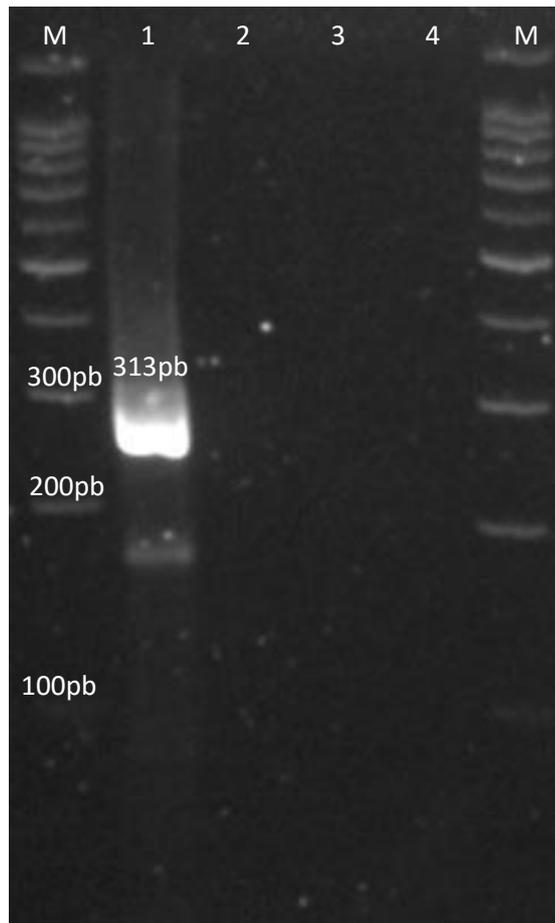


Figura 22 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *aaiC*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E41, 2 – ADN extraído por fervura da referência HH8 (14/1), 3 – ADN extraído por fervura da referência *E. coli* HH8 (13/12), 4 – Branco (água estéril)

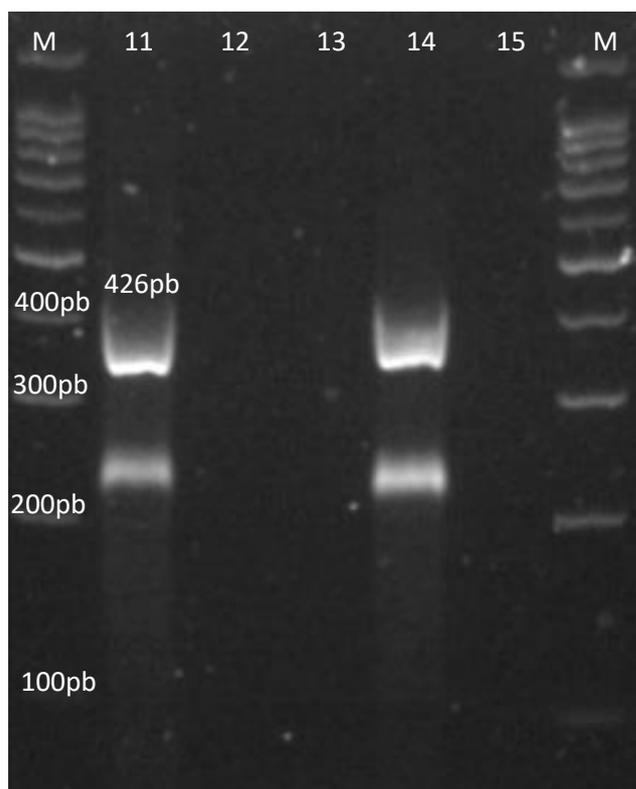


Figura 23 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *aggR*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 11 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E41, 12 – ADN extraído por fervura da referência HH8 (14/1), 13 – ADN extraído por fervura da referência *E. coli* HH8 (13/12), 14 – ADN extraído por fervura da referência 417 gene *aggR*+ (23/3/2018), 15 – Branco (água estéril)

Com os resultados obtidos, decidiu-se fazer, para ambos os genes, uma nova extração de ADN das estirpes controlo positivo LMV_E41 e 417 gene *aggR*+ (23/3/2018), pois o aspeto das bandas amplificadas aparentavam que o ADN pudesse estar degradado, e fazer um gradiente crescente de temperatura para a temperatura de emparelhamento, pois pretendia-se eliminar a banda inespecífica com menor par de bases que surgia.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, diminuindo um pouco a intensidade da corrente para 90V. Os resultados obtidos são os apresentados abaixo, nas figuras 24 e 25.

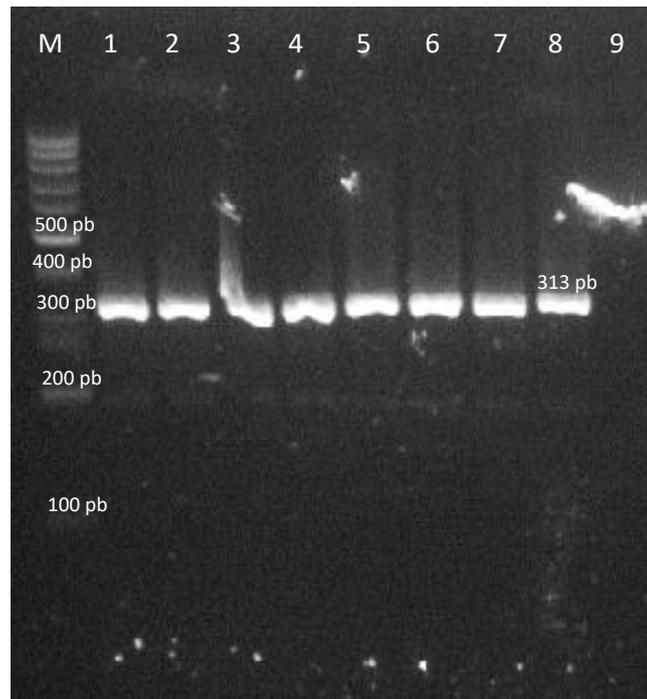


Figura 24 – Amplificação por PCR para otimizar condições com gradiente crescente de temperatura de emparelhamento para o gene *aaiC*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 2 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 3 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 4 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 5 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 6 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 7 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 8 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 9 – Branco (água estéril)

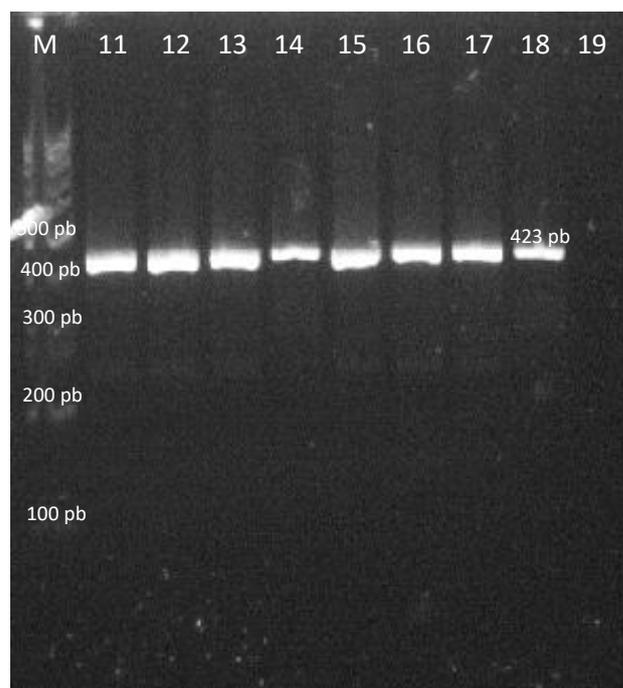


Figura 25 – Amplificação por PCR para otimizar condições com gradiente crescente de temperatura de emparelhamento para o gene *aggR*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 2 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 3 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 4 – ADN extraído por fervura do controlo positivo LMV_E4I (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 5 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 6 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 7 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 8 – ADN extraído por fervura do controlo positivo 417 gene *aggR* + (23/3/2018) (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 9 – Branco (água estéril)

Após a observação dos géis decidiu-se utilizar a estirpe controlo positivo LMV_E4I para ambos os genes e o perfil térmico apresentado na tabela II com a temperatura de emparelhamento de 58 °C, visto ser a sugerida por Boisen e colaboradores (Boisen *et al.*, 2012) e porque com a nova extração do ADN não parecem existir muitas diferenças quanto à amplificação da banda pretendida.

Relativamente ao gene *ipaH*, gene característico de EIEC, os resultados primeiramente obtidos foram os apresentados na figura 26.

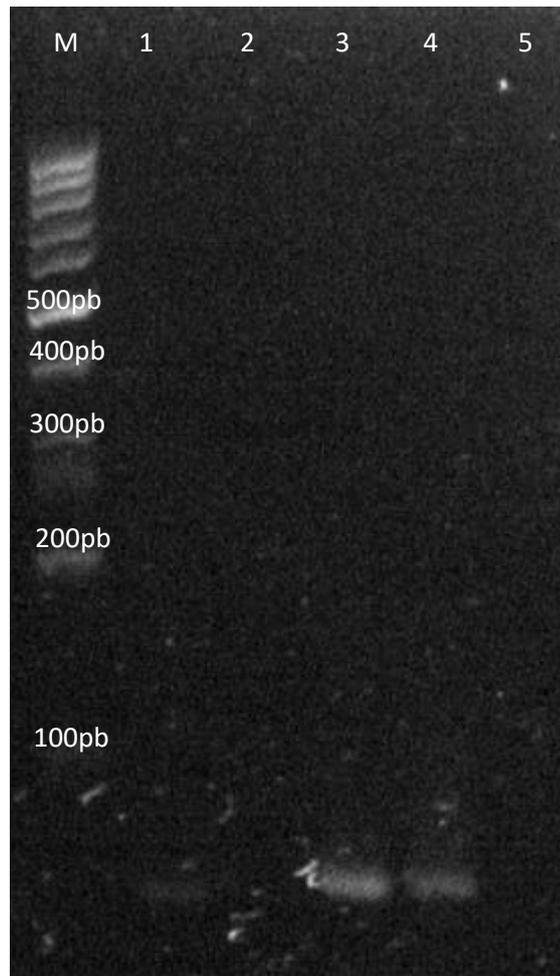


Figura 26 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *ipaH*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E40, 2 – ADN extraído por fervura da referência 5col. Shigella, 3 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 29/8, 4 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 6/7, 5 – Branco (água estéril)

Perante estes resultados decidiu-se manter o perfil térmico inalterado (Tabela 10) e modificar um pouco os volumes da mistura para a PCR, conforme descritos na tabela 12. Os resultados obtidos correspondem à figura 27.

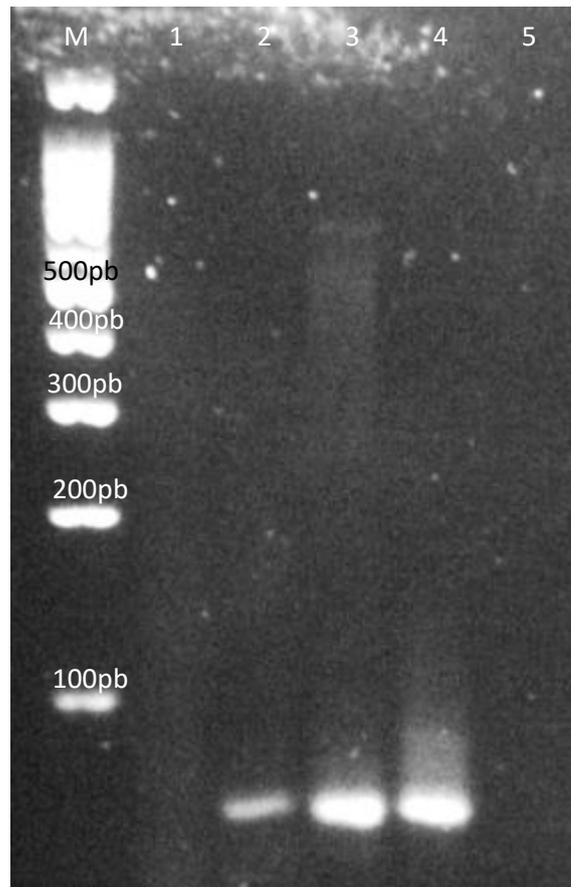


Figura 27 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *ipaH*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E40, 2 – ADN extraído por fervura da referência 5col. Shigella, 3 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 29/8, 4 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 6/7, 5 – Branco (água estéril)

Perante estes resultados decidiu-se continuar com o mesmo perfil térmico e aumentar um pouco a quantidade de ADN a utilizar na mistura para a PCR, visto que se consegue observar uma banda, embora bastante fraca, na figura anterior. Nesta otimização, adicionou-se, ainda, mais duas estirpes controlo positivo, que foram encontradas posteriormente na coleção do INSA e que estavam identificadas com portadoras deste gene: 2535/1993 e ATCC I2022. Os resultados obtidos são os apresentados na figura 28.

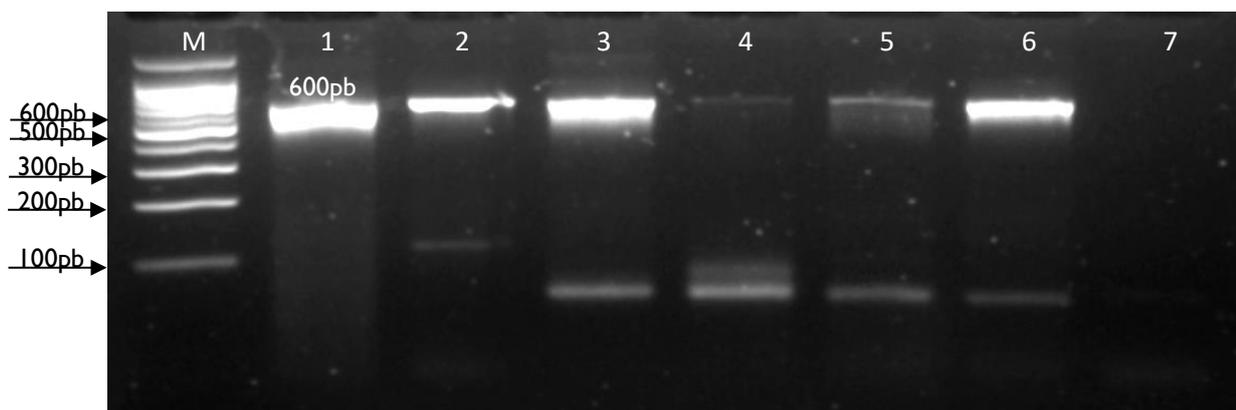


Figura 28 – Amplificação por PCR para otimizar condições para o gene *ipaH*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E40, 2 – ADN extraído por fervura da referência 5col. Shigella, 3 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 29/8, 4 – ADN extraído por fervura do Fragmento Shigella 6/7, 5 – ADN extraído por fervura da referência 2535/1993, 6 – ADN extraído por fervura da estirpe controlo positivo ATCC 12022, 7 – Branco (água estéril)

Perante os resultados obtidos, decidiu-se utilizar, com as condições apresentadas nas tabelas 10 e 13, presentes no Capítulo III – Materiais e Metodologias, a estirpe LMV_E40 como controlo positivo para o gene *ipaH*.

Relativamente ao gene *bfpA*, os resultados obtidos com a mistura da PCR e o perfil térmico apresentados nas tabelas 9 e 10 (Capítulo III – Materiais e Metodologias) foram os apresentados na figura 29.

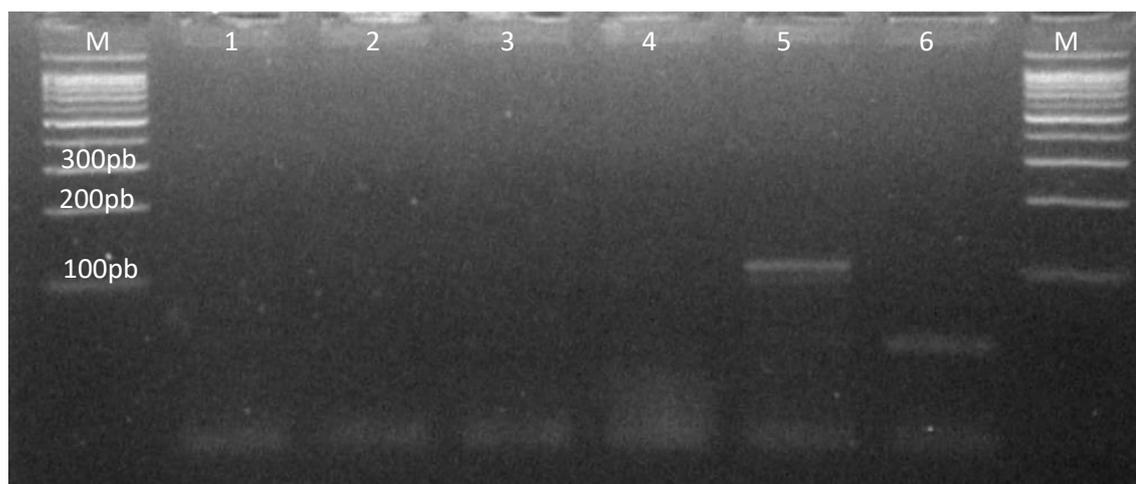


Figura 29 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído da referência LMV_E37, 2 – ADN da referência D3546A, 3 – ADN da referência F (D3546 – 21/12/12), 4 – ADN da referência D3546A VTEC (12/9/16), 5 – ADN extraído de estirpe com gene *eae* + (764974) para pesquisa do gene *bfpA*, 6 – Branco (água estéril)

Após a observação do gel decidiu-se usar o mesmo perfil térmico, apresentado na tabela 10, e adaptar as quantidades da mistura para a PCR, apresentadas na tabela 14, presentes no Capítulo III – Materiais e Metodologias.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 30):

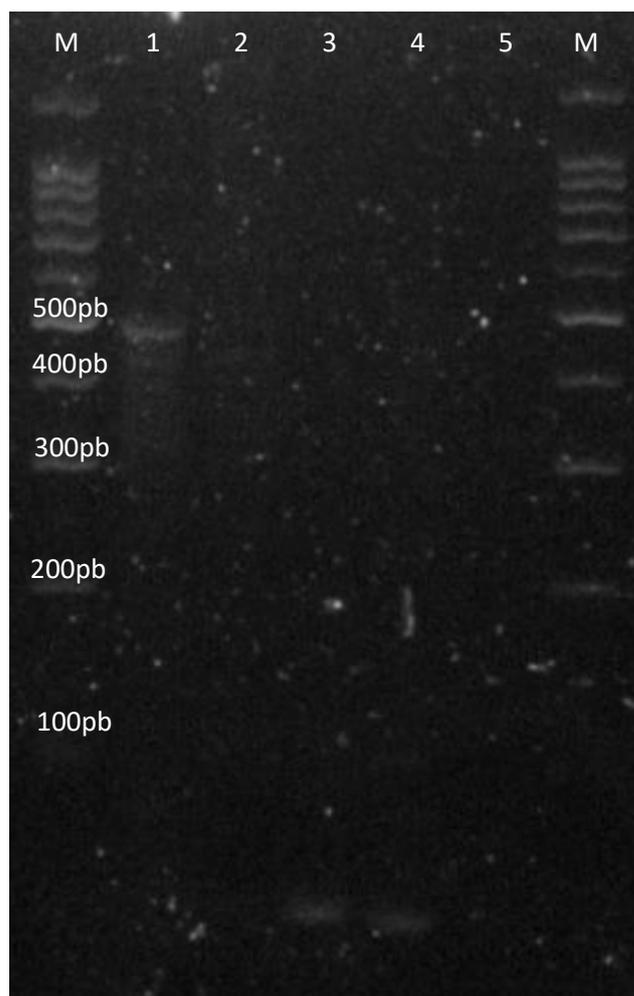


Figura 30 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37, 2 – ADN extraído por fervura da referência D3546A, 3 – ADN extraído por fervura da referência F (D3546 – 21/12/12), 4 – ADN extraído por fervura da referência D3546 VTEC (12/9/16), 5 – Branco (água estéril)

Após a análise dos resultados decidiu-se continuar com as condições utilizadas no termociclador, apresentadas na tabela 10 (Capítulo III), e aumentar um pouco a quantidade de ADN presente na mistura para a PCR (Tabela 15 do mesmo capítulo).

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 31):

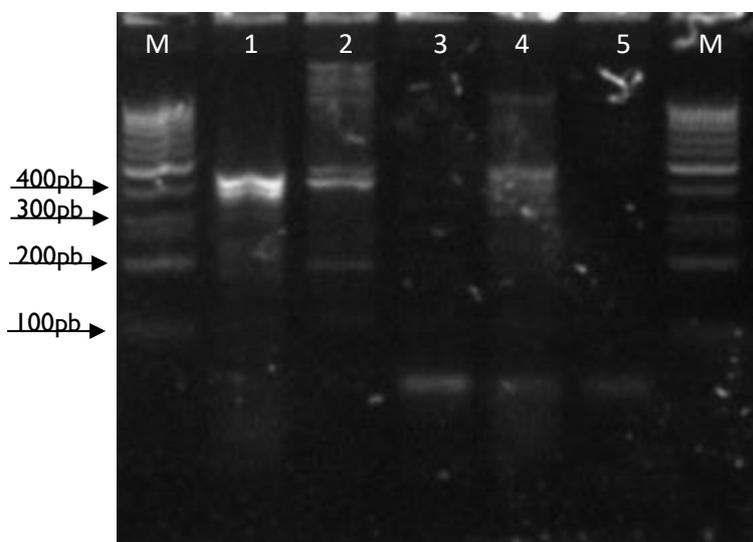


Figura 31 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA*

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37, 2 – ADN extraído por fervura da referência D3546A, 3 – ADN extraído por fervura da referência F (D3546 – 21/12/12), 4 – ADN extraído por fervura da referência D3546 VTEC (12/9/16), 5 – Branco (água estéril)

Perante estes resultados decidiu-se utilizar apenas as estirpes controlo positivo LMV_E40 e D3546A e realizar um gradiente crescente para a temperatura de emparelhamento, como apresentado na tabela 27, e manter as condições usadas na mistura para a PCR, apresentadas na tabela 15 presente no Capítulo III – Materiais e Metodologias.

Tabela 27 – Perfil térmico usado para testar condições para a deteção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	61 °C-65 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
		40 ciclos		

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 90 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 32):

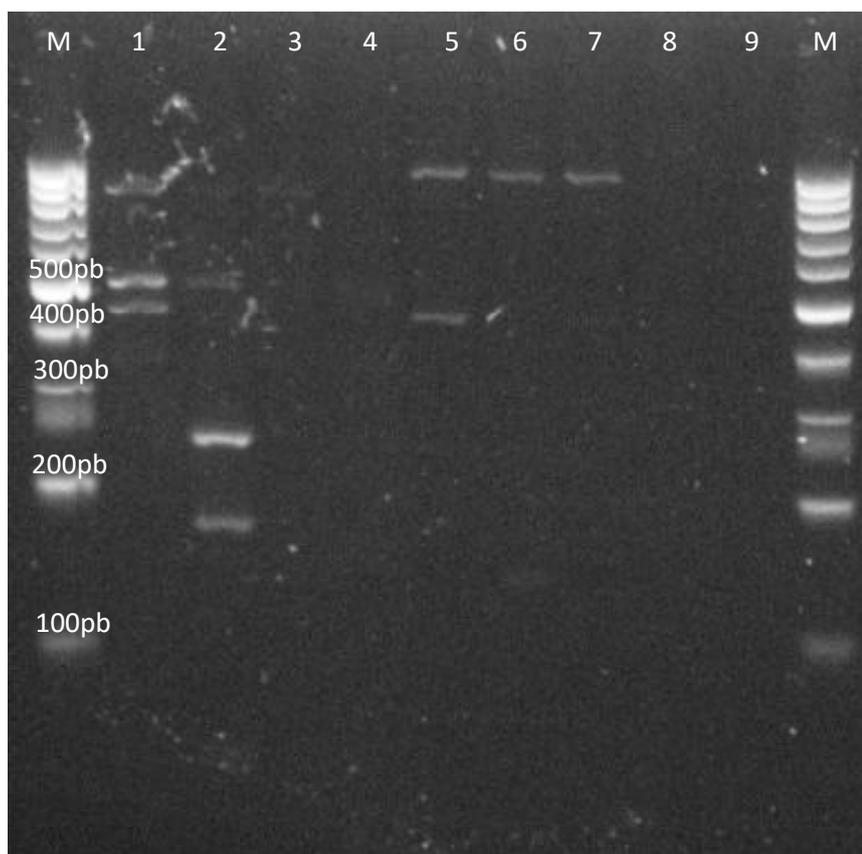


Figura 32 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente crescente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 61 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 63 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 5 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 61 °C), 6 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 7 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 63 °C), 8 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 9 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 62 °C)

Perante os resultados obtidos percebeu-se que com a diminuição da temperatura de emparelhamento, o número de bandas, embora inespecíficas, aumentava e, por isso, decidiu-se realizar outro gradiente da temperatura para a temperatura de emparelhamento com temperaturas mais baixas que as testadas anteriormente, como apresentado na tabela 28, e manter as condições usadas na mistura para a PCR, apresentadas na tabela 15.

Tabela 28 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	58 °C-60 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
	40 ciclos			

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 90 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 33):

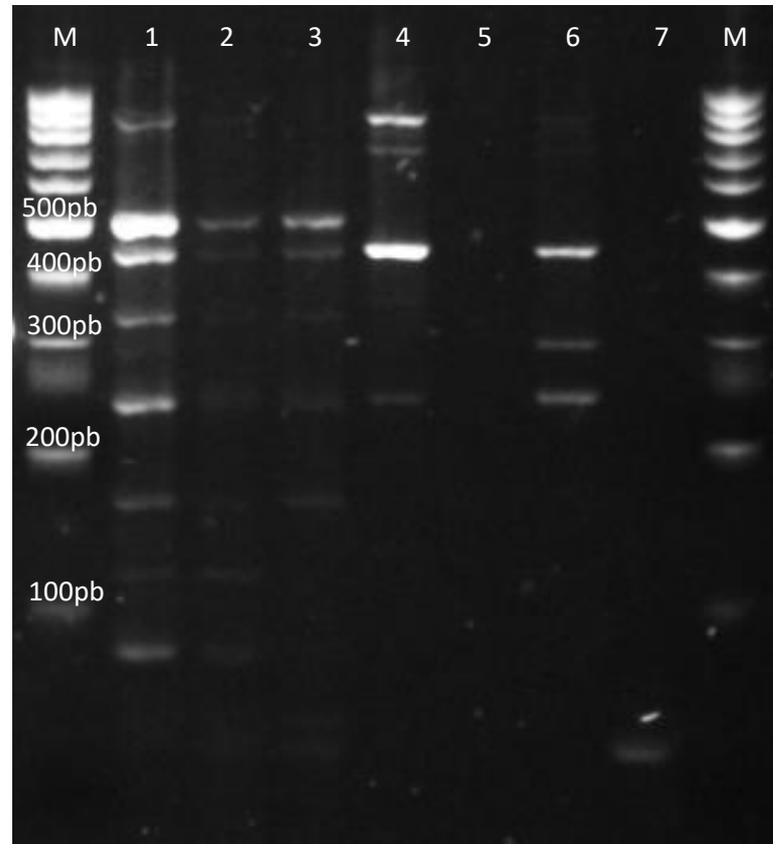


Figura 33 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente crescente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 59 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 5 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 59 °C), 6 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 7 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 60°C)

Com base nos resultados obtidos, percebeu-se com a estirpe LMV_E37 e com a temperatura de emparelhamento de 58 °C, surgia uma banda com intensidade considerável um pouco acima dos 300pb e suspeitou-se que pudesse ser a banda que se procurava. De forma a tentar eliminar as bandas inespecíficas tentou-se alterar a constituição da mistura começando por adicionar iões Mg^{2+} , através da adição de $MgCl_2$ à mistura da PCR como apresentado na tabela 16.

Decidiu-se realizar também dois gradientes da temperatura para a temperatura de emparelhamento distintos, conforme apresentado nas tabelas 29 e 30.

Tabela 29 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	50 °C-58 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
	40 ciclos			

Tabela 30 – Perfil térmico usado para testar condições para a detecção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda et al., 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	63 °C-65 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
	40 ciclos			

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 50 minutos a 100V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figuras 34 e 35):

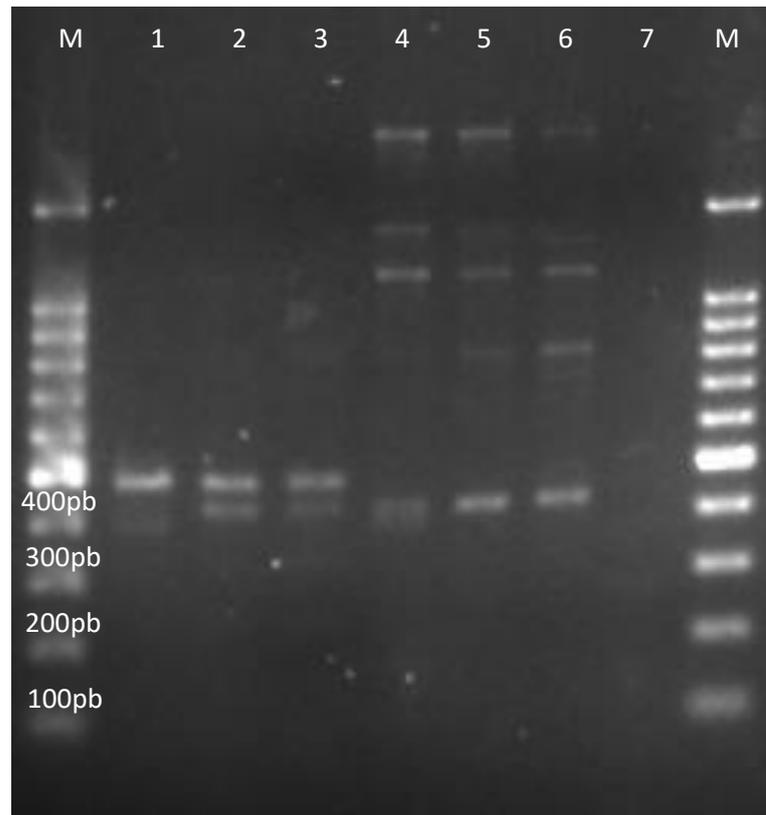


Figura 34 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 50 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 55 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 50 °C), 5 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 55 °C), 6 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 7 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 50 °C)

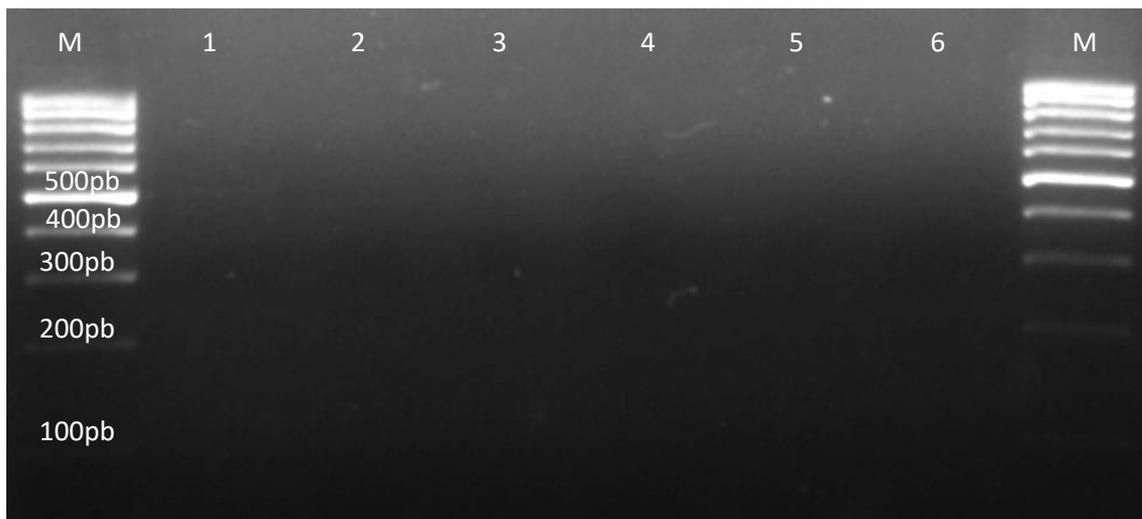


Figura 35 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 63 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência D3546A (Temperatura de emparelhamento: 63 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência D3546A

Resultados e Discussão

(Temperatura de emparelhamento: 65 °C), 5 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 63 °C), 6 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 65 °C)

Após a incorporação de $MgCl_2$ na mistura da PCR, verificou-se que com o aumento da temperatura de emparelhamento, o número de bandas inespecíficas diminuía para a estirpe controlo positivo LMV_E37 e, por isso, decidiu-se usar apenas essa estirpe nesta fase da otimização, pois era a que apresentava menor número de bandas inespecíficas e decidiu-se utilizar a mesma constituição da mistura da PCR, variando apenas o volume de ADN utilizado, apresentado na tabela 17 e realizar um gradiente crescente da temperatura de emparelhamento, apresentado na tabela 31.

Tabela 31 – Perfil térmico usado para testar condições para a deteção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	56 °C-62 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
		40 ciclos		

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 60 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 36):

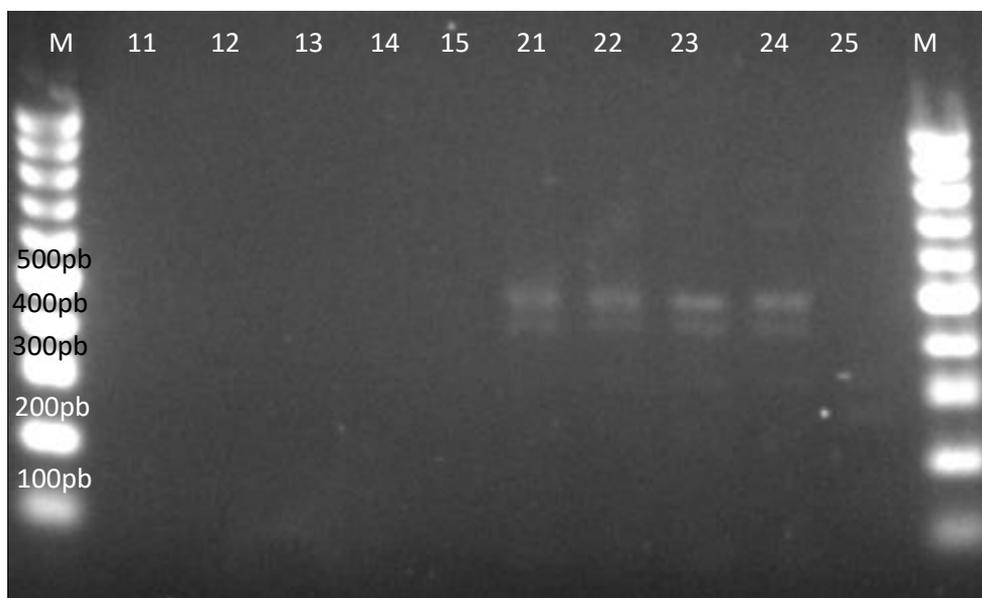


Figura 36 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 11 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (1µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 56 °C), 12 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (1µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 13 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (1µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 14 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (1µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 15 – Branco (s água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 21 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (2µL de ADN – Temperatura de

emparelhamento: 56 °C), 22 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (2µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 23 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (2µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 24 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (2µL de ADN – Temperatura de emparelhamento: 62 °C), 25 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C)

Após a obtenção destes resultados, percebeu-se que a quantidade mínima de ADN que se deve usar na PCR ronda os 2µL.

Posteriormente a esta tentativa de otimizar as condições para o gene *bfpA* e por último, ainda com base no estudo de Aranda *et al.* (2004), decidiu-se realizar uma nova PCR, conforme descrita na tabela 9, e utilizar o perfil térmico, com um gradiente de temperatura para a temperatura de emparelhamento, conforme apresentado na tabela 32, previamente otimizado para o gene *ipaH* (gene que também é descrito no mesmo artigo), na tentativa de perceber se se conseguiria obter a banda característica do gene.

Tabela 32 – Perfil térmico usado para testar condições para a deteção do gene *bfpA* (Adaptado de Aranda *et al.*, 2004)

Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final
95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	55 °C-60 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos
		40 ciclos		

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 60 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 37):

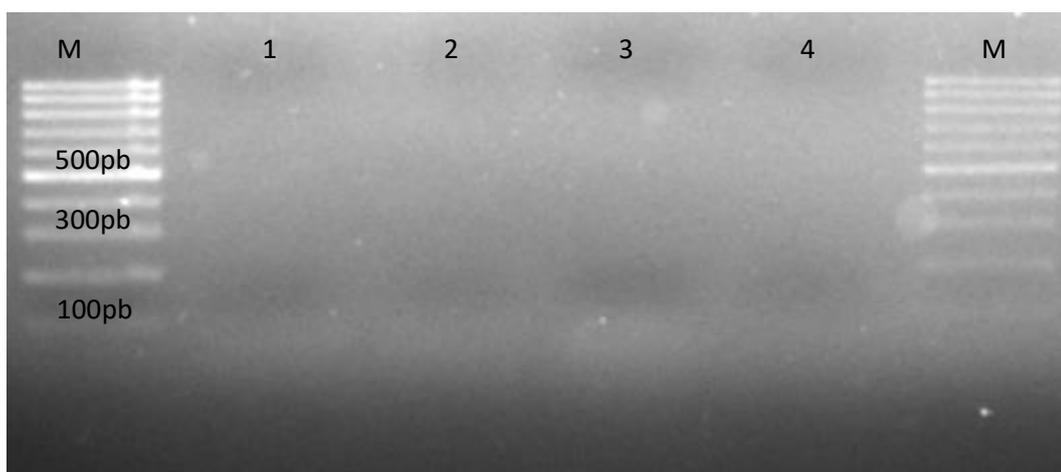


Figura 37 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* com gradiente de temperaturas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 55 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 4 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C)

Como se pode verificar pelos resultados apresentados acima, não se conseguiu otimizar as condições da PCR para a pesquisa deste gene com base em Aranda *et al.* (2004), e por isso fez-se uma nova pesquisa bibliográfica com base na sequência de nucleótidos dos primers, de artigos que contivessem a descrição da constituição da mistura para a PCR e do perfil térmico diferentes daqueles que já tinham sido testados.

Primeiramente, com base em Mohammadeh *et al.* (2017), utilizaram-se as estirpes controlo positivo presentes no banco de estirpes do INSA (LMV_E37, D3546A, F (D3546 – 21/12/12) e D3546A VTEC (12/9/16)), referentes ao gene *bfpA*, característico do patotipo EPEC, utilizou-se os volumes apresentados na tabela 18 e o perfil térmico apresentado na tabela 19 (ver Capítulo III).

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 80 minutos a 100V e visualizou-se sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 38):

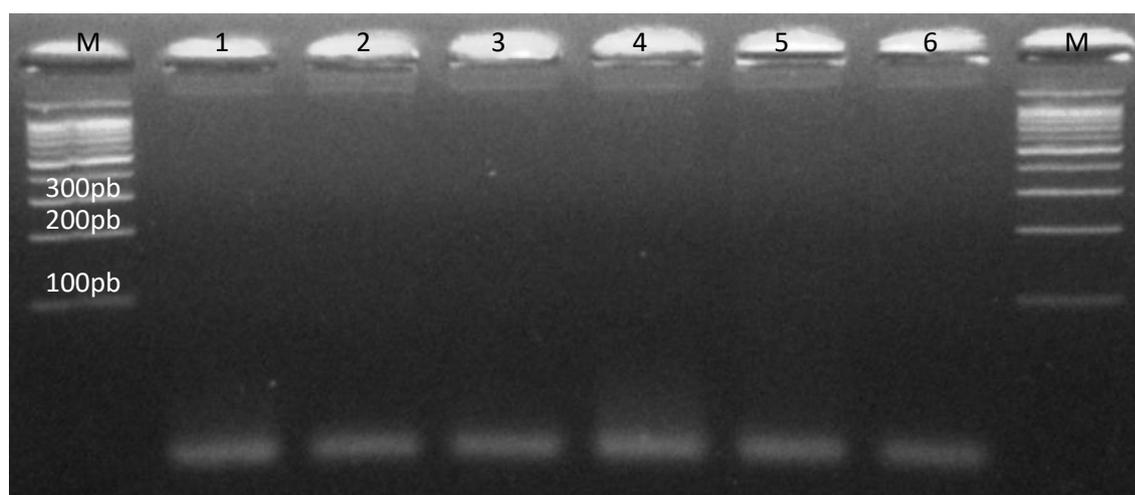


Figura 38 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* segundo Mohammadeh *et al.* (2017)

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 em 500µL de água, 2 – ADN da referência D3546A, 3 – ADN da referência F (D3546 – 21/12/12), 4 – ADN da referência D3546A VTEC (12/9/16), 5 – ADN extraído de estirpe com gene *eae* + (764974) para pesquisa do gene *bfpA*, 6 – Branco (água estéril)

Visto que os resultados obtidos não foram os esperados porque não se conseguiu amplificar a banda pretendida, decidiu-se usar condições descritas noutro estudo (Alikhani *et al.*, 2006) e usar apenas a estirpe controlo positivo LMV_E37 pois tem parecido, ao longo de todas as PCR realizadas, ser a que apresenta menor número de bandas inespecíficas.

Em seguida, com base em Alikhani *et al.* (2006), realizou-se um gradiente de temperatura, utilizando os volumes apresentados na tabela 20 e o perfil térmico apresentado na tabela 21, presentes no Capítulo III – Materiais e Metodologias. Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 50 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos são os apresentados na figura 39.

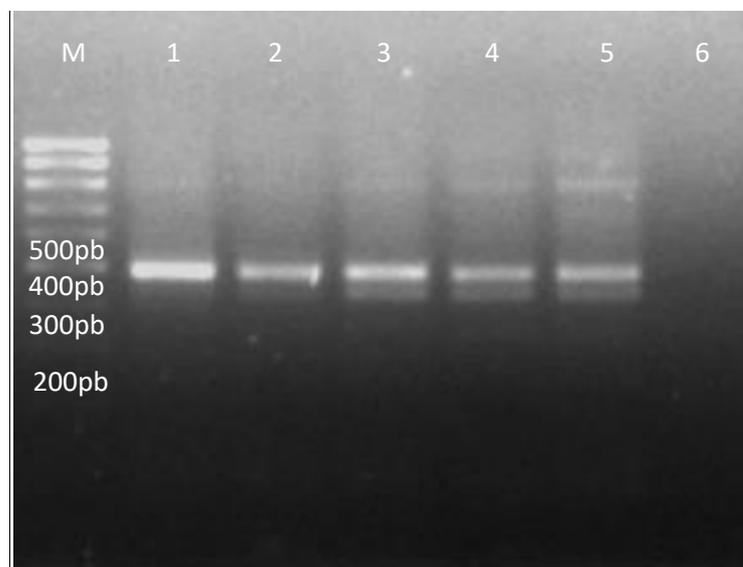


Figura 39 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* segundo Alikhani *et al.* (2006)

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 50 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 52,5 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 55,5 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 5 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 6 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 58 °C)

Perante os resultados obtidos, decidiu-se realizar, com base em Huasai *et al.* (2012), um gradiente de temperatura, utilizando os volumes apresentados na tabela 22 e o perfil térmico apresentado na tabela 23, presentes no Capítulo III – Materiais e Metodologias.

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 50 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 40):

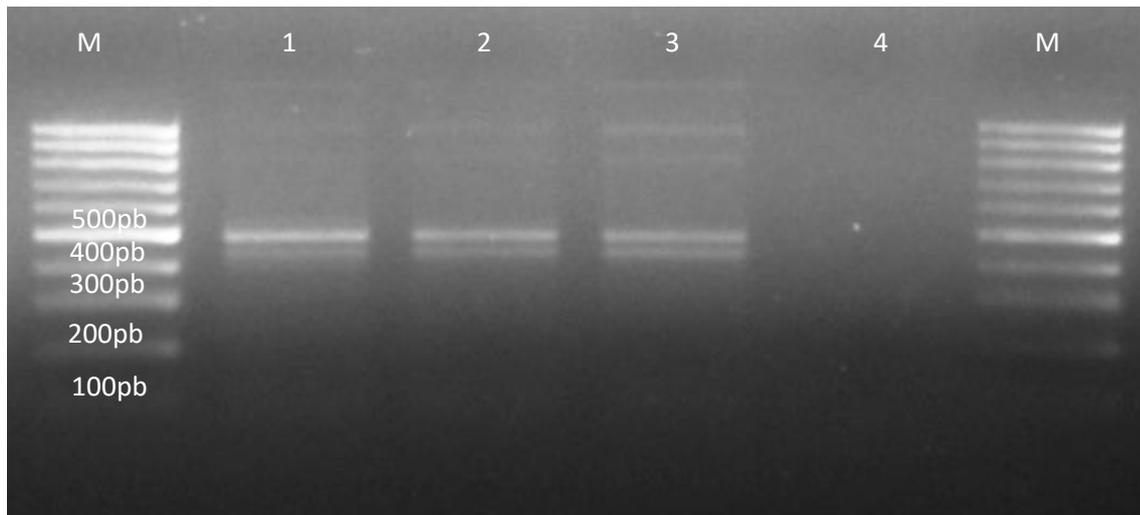


Figura 40 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* segundo Huasai *et al.* (2012)

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 55 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 57,5 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 60 °C), 4 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 55 °C)

Após a análise dos resultados, decidiu-se realizar, com base em Li *et al.* (2012), um gradiente de temperatura, utilizando os volumes e perfil térmico apresentados na tabela 24 e 25, respetivamente (Capítulo III – Materiais e Metodologias).

Após a PCR efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 60 minutos a 90V e visualizado sob luz UV num transiluminador. Os resultados obtidos foram os seguintes (Figura 41):

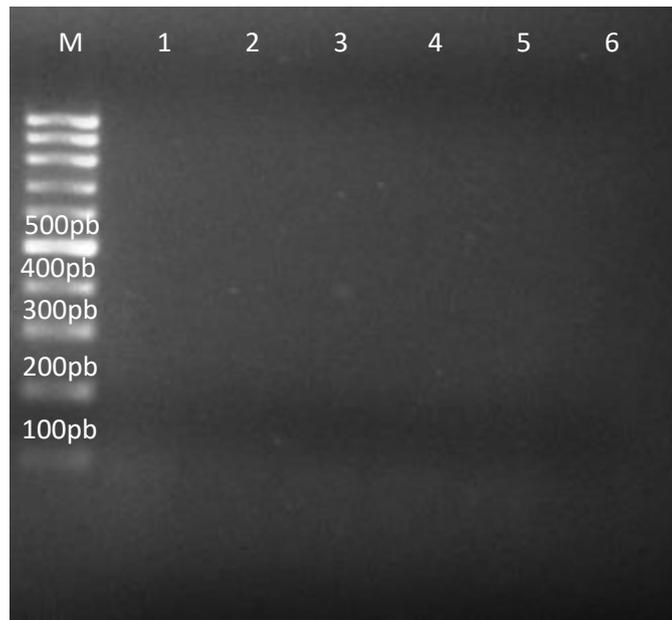


Figura 41 – Amplificação por PCR para testar condições de otimização para o gene *bfpA* segundo Li *et al.* (2012)

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 50 °C), 2 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 52 °C), 3 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 54,5 °C), 4 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 56,5 °C), 5 – ADN extraído por fervura da referência LMV_E37 (Temperatura de emparelhamento: 58 °C), 6 – Branco (água estéril) (Temperatura de emparelhamento: 50 °C)

Como se pode verificar, apesar de se ter tentado através de gradientes de temperatura, de diversas alterações na mistura da PCR e de se adicionar iões Mg^{2+} e de se ter consultado diversas fontes bibliográficas, não se conseguiu otimizar as condições da PCR para este gene.

Relativamente aos genes *eae*, *eltB* e *estA*, *stx1* e *stx2*, estes já foram previamente testados aquando da otimização de condições para a extração de ADN, a partir de estirpes controlo positivo, o que se pode verificar no ponto 4.1., nas figuras 14, 15, 12 e 13, respetivamente.

Em suma, as constituições da mistura para a PCR de cada gene e os perfis térmicos a usarem-se para cada gene devem ser os apresentados nas tabelas 33, 34 e 35, respetivamente.

Tabela 33 – Misturas a utilizar para a realização da PCR para cada gene, após otimização das condições

Genes	Componentes da mistura	Volumes para uma reação, em μL ($V_{\text{total}} = 25\mu\text{L}$)	Referências
<i>pCVD432</i>	Água estéril	18,85	Aranda et al. (2004)
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 2mM)	1,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,15	
	ADN	1,0	
<i>astA</i> , <i>aaiC</i> e <i>aggR</i> (em PCR simples)	Água estéril	7,2	Boisen et al. (2008)
	MasterMix (2x)	13,6	
	Primer F (a 10 μM)	0,6	
	Primer R (a 10 μM)	0,6	
	ADN	3,0	
<i>ipaH</i>	Água estéril	15,68	Adaptado de Aranda et al. (2004)
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 2mM)	3,12	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,2	
	ADN	2,5	
<i>eltB</i> e <i>estA</i> (em PCR simples)	Água estéril	14,375	Adaptado de Campos et al. (2015), Nguyen et al. (2005) e Fujioka et al. (2013)
	MgCl ₂	1,5	
	Tampão da Taq	5,0	
	dNTPs (a 2mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,75	
	Primer R (a 10 μM)	0,75	
	Taq polimerase (a 5U)	0,125	
	ADN	2,0	
<i>eae</i>	Água estéril	15,9	ISO 13136:2012
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 10mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,1	
	ADN	5,0	
<i>stx1</i> e <i>stx2</i>	Água estéril	14,9	ISO 13136:2012
	Tampão da Taq	2,5	
	dNTPs (a 10mM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Primer F (a 10 μM)	0,5	
	Primer R (a 10 μM)	0,5	
	Taq polimerase (a 5U)	0,1	
	ADN	5,0	

Tabela 34 – Perfis térmicos otimizados para a PCR para cada gene

Gene	Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final	Referência
<i>pCVD432</i>	95 °C, 5 minutos	95 °C, 40 segundos	58 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos	72 °C, 7 minutos	Aranda et al. (2004)
		40 ciclos				
<i>astA</i> , <i>aaiC</i> e <i>aggR</i>	95 °C, 2 minutos	94 °C, 50 segundos	58 °C, 90 segundos	72 °C, 90 segundos	72 °C, 10 minutos	Boisen et al. (2012)
		35 ciclos				
<i>ipaH</i>	95 °C, 5 minutos	95 °C, 45 segundos	50 °C, 1 minuto	72 °C, 1 minuto	72 °C, 7 minutos	Aranda et al. (2004)
		40 ciclos				
<i>eltB</i> e <i>estA</i>	94 °C, 4 minutos	94 °C, 1 minuto	55 °C, 1 minuto	72 °C, 1 minuto	72 °C, 4 minutos	Adaptado de Campos et al. (2015), Nguyen et al. (2005) e Fujioka et al. (2013)
		35 ciclos				

Tabela 35 – Perfil térmico a utilizar na PCR dos genes *stx1* e *stx2* (VTEC) e *eae* (EPEC)

Ciclo I-10	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	65 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo II-15	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	65 °C durante 120 segundos (a temperatura deve baixar 1 °C por ciclo até aos 60 °C)
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo I6-25	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	60 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 90 segundos
Ciclo 26-35	Desnaturação	95 °C durante 60 segundos
	Emparelhamento	60 °C durante 120 segundos
	Extensão	72 °C durante 150 segundos
Referência	Norma ISO 13136:2012	

4.3. Teste da PCR para identificação de *E. coli* patogénicas isoladas de géneros alimentícios

Após a otimização das condições para as reações da PCR com as estirpes controlo positivo, realizou-se PCR de forma a analisar as 100 estirpes em estudo.

Apesar das condições de alguns genes serem iguais, não foi possível a realização da PCR multiplex em nenhum gene, à exceção dos genes *stx1* e *stx2* (característicos da VTEC), pois, no caso dos genes da ETEC (genes *estA* e *eltB*) os primers mostravam ter preferência para a amplificação de um dos genes (gene *estA*), ou o que acontecia era que as bandas amplificadas ficavam tão próximas que a sua distinção tornava-se bastante complicada, como acontecia no caso dos genes *aggR* e *aaiC*, característicos de EAEC.

De uma forma generalizada obtiveram-se resultados positivos nas pools B, E, F, H e I, para os genes *estA* e *astA*, como se pode verificar através da tabela 36 e nas imagens 42 e 43, abaixo apresentadas.

Nas restantes pools não foi possível detetar, por PCR convencional, nenhum resultado positivo para nenhum dos genes pesquisados.

Tabela 36 – Resultados da PCR para as pools

Pools	Gene <i>estA</i>	Gene <i>astA</i>
A	–	–
B	–	+
C	–	–
D	–	–
E	–	+
F	–	+
G	–	–
H	+	+
I	–	+
J	–	–

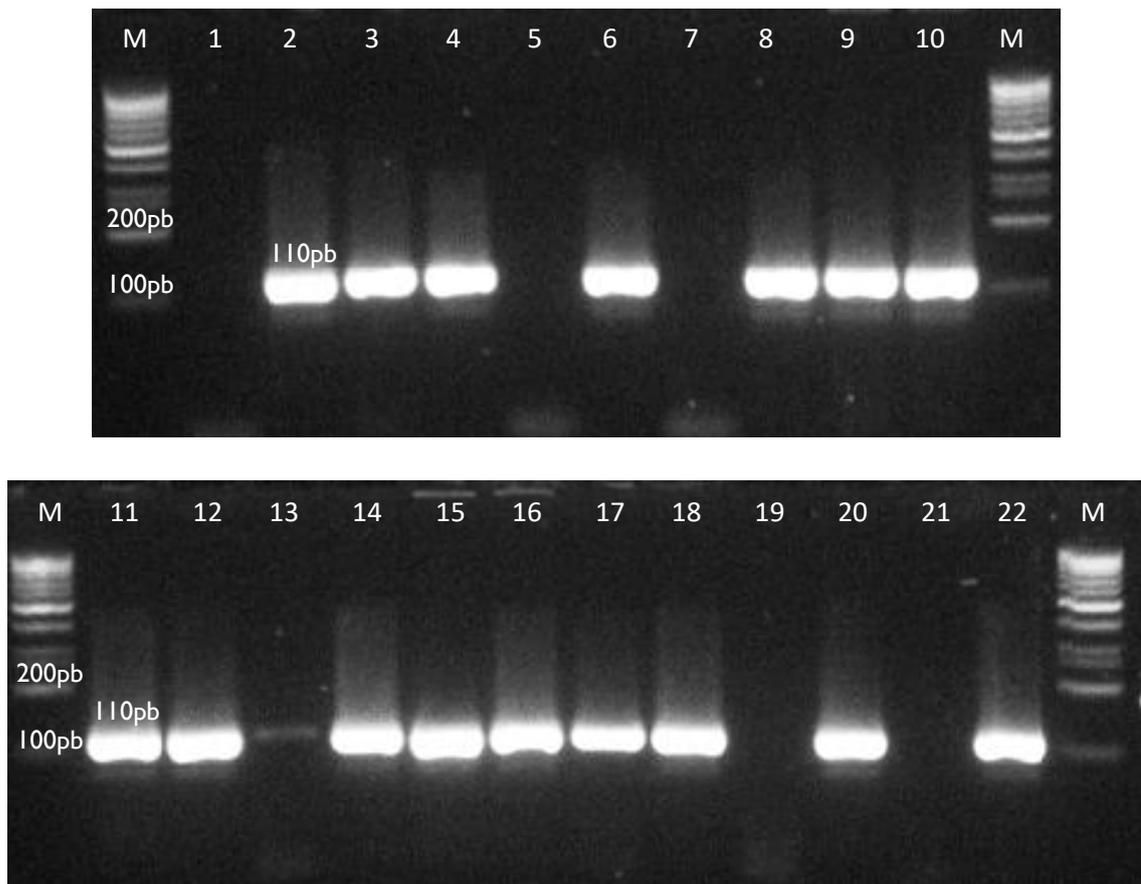
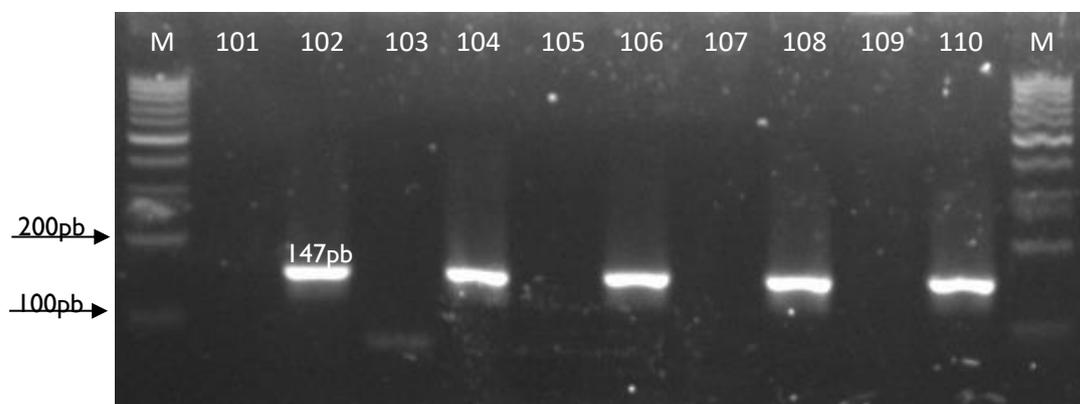


Figura 42 – Amplificação por PCR, para o gene *astA*, de ADN extraído por fervura, a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – Pool A “pick up” (composta por 1 “pick-up” de 1 colônia de cada estirpe até perfazer 10 colônias em 250 μ L de água), 2 – Controlo interno de (A) – (4 μ L de amostra + 1 μ L de positivo), 3 – Pool B “pick up”, 4 – Controlo interno de (C), 5 – Pool C “pick up”, 6 – Controlo interno de (E), 7 – Pool D “pick up”, 8 – Controlo interno de (G), 9 – Pool E “pick up”, 10 – Controlo interno de (I), 11 – Pool F “pick up”, 12 – Controlo interno de (K), 13 – Pool G “pick up”, 14 – Controlo interno de (M), 15 – Pool H “pick up”, 16 – Controlo interno de (O), 17 – Pool I “pick up”, 18 – Controlo interno de (Q), 19 – Pool J “pick up”, 20 – Controlo interno de (S), 21 – Branco (água estéril), 22 – Controlo positivo (D3509E).



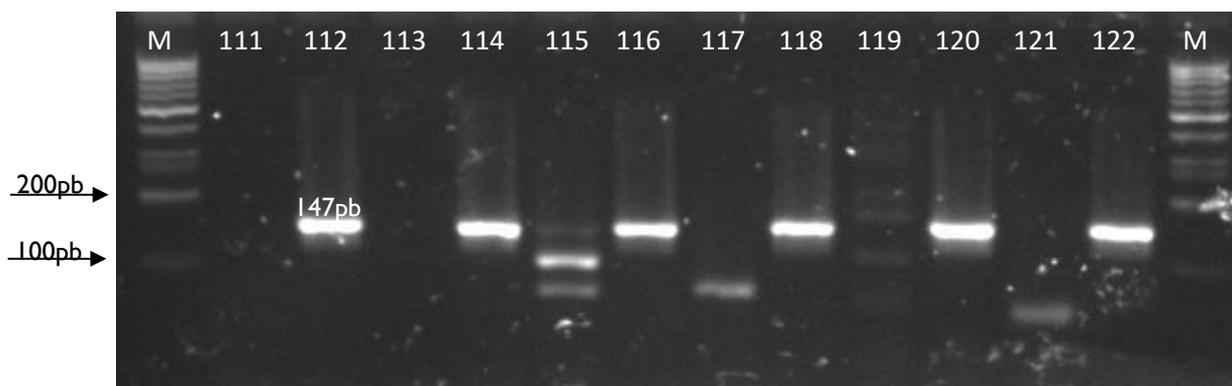
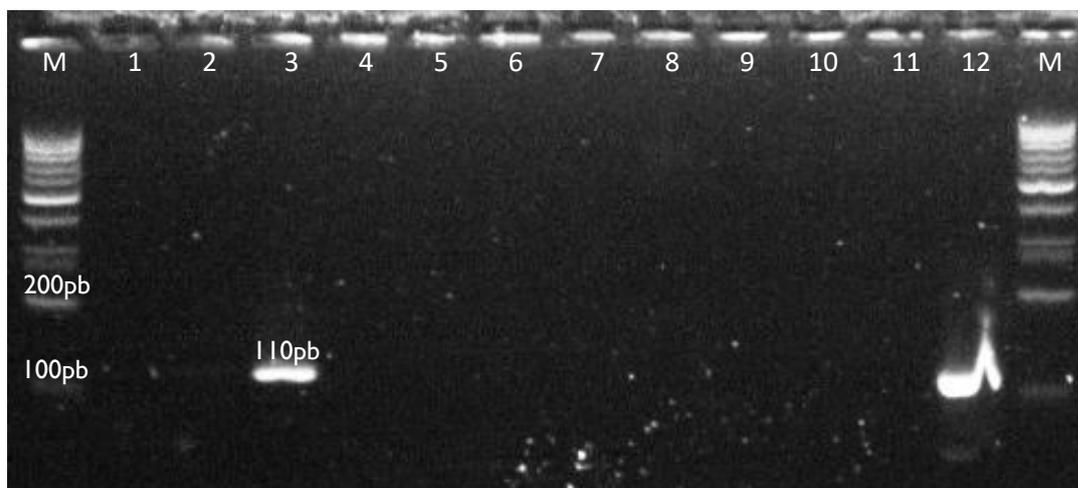
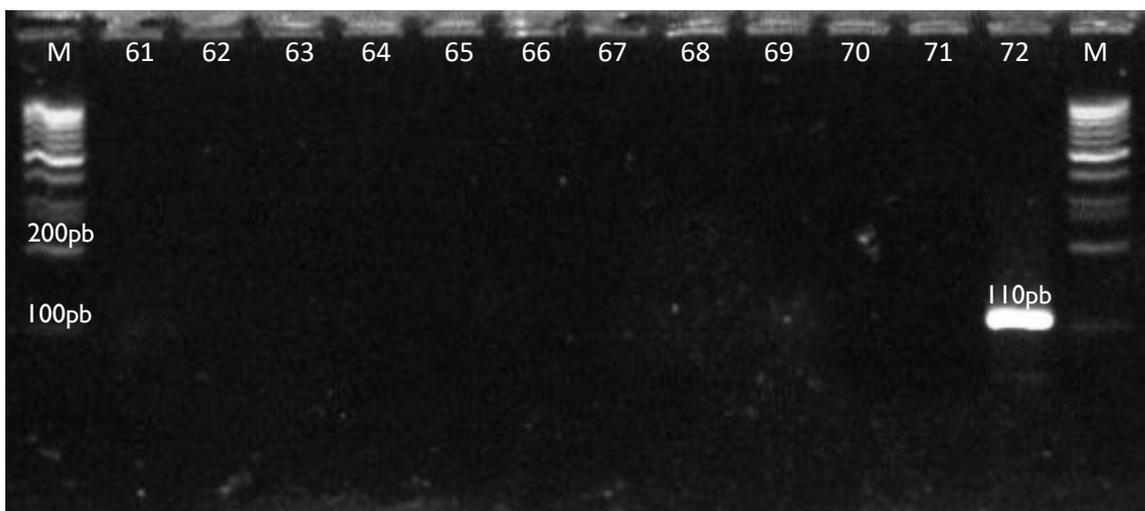
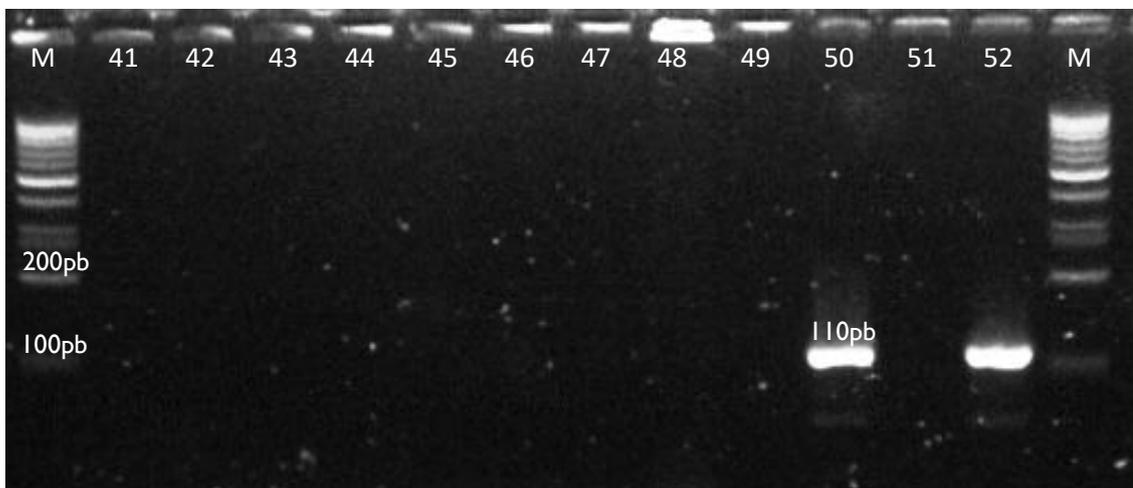
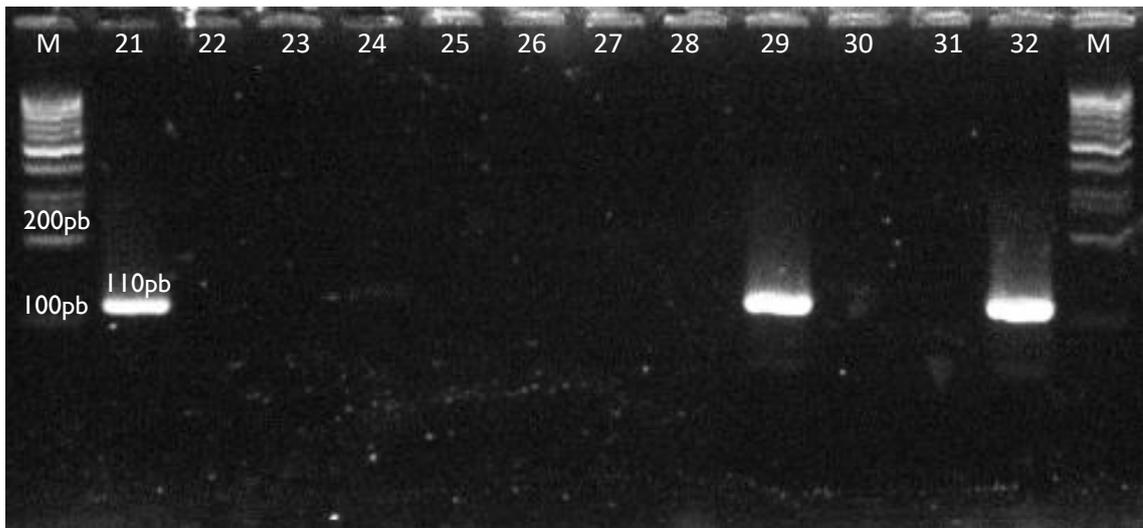


Figura 43 – Amplificação por PCR, para o gene *estA*, de ADN extraído por fervura, a partir de pools que contêm 10 estirpes distintas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 101 – Pool A “pick up” (composta por 1 “pick-up” de 1 colónia de cada estirpe até perfazer 10 colónias em 250µL de água), 102 – Controlo interno de (1) – (1µL de amostra + 1µL de controlo positivo), 103 – Pool B “pick up”, 104 – Controlo interno de (3), 105 – Pool C “pick up”, 106 – Controlo interno de (5), 107 – Pool D “pick up”, 108 – Controlo interno de (7), 109 – Pool E “pick up”, 110 – Controlo interno de (9), 111 – Pool F “pick up”, 112 – Controlo interno de (11), 113 – Pool G “pick up”, 114 – Controlo interno de (13), 115 – Pool H “pick up”, 116 – Controlo interno de (15), 117 – Pool I “pick up”, 118 – Controlo interno de (17), 119 – Pool J “pick up”, 120 – Controlo interno de (19), 121 – Branco (água estéril), 122 – Controlo positivo (LMV_E38).

De forma a perceber qual seria a estirpe que continha o gene em pesquisa e perante os resultados obtidos para as pools, analisou-se com maior detalhe todas as pools suspeitas (Pools B, E, F, G, H e I para o gene *astA* e as Pools H e J para o gene *estA*), como descrito no capítulo da Metodologia e concluiu-se que as estirpes positivas para o gene *astA* são a B3, E1, E9, F10, H10 e I5 e a estirpe positiva para o gene *estA* é a H4, como se pode verificar nas figuras 44 e 45.





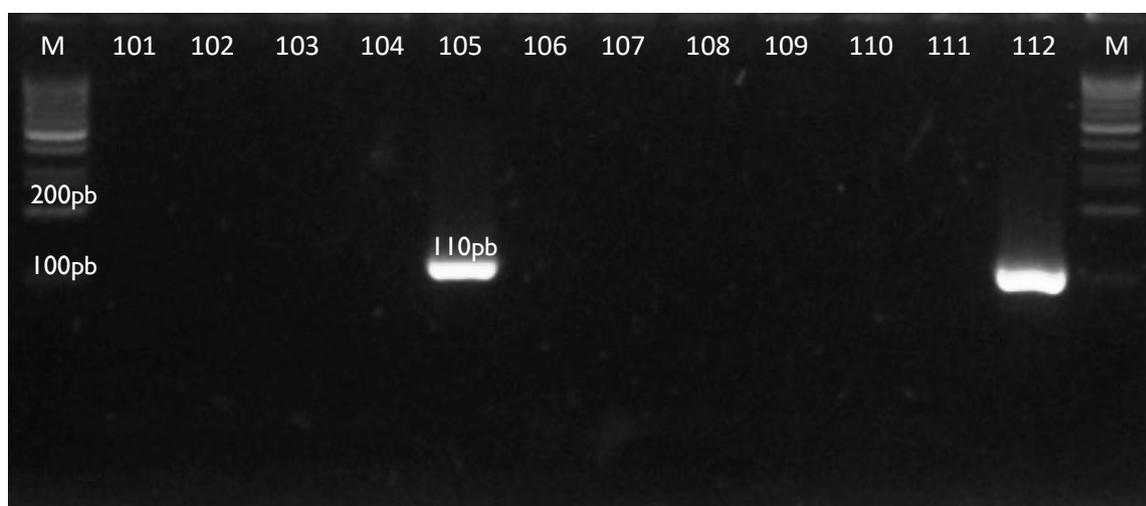
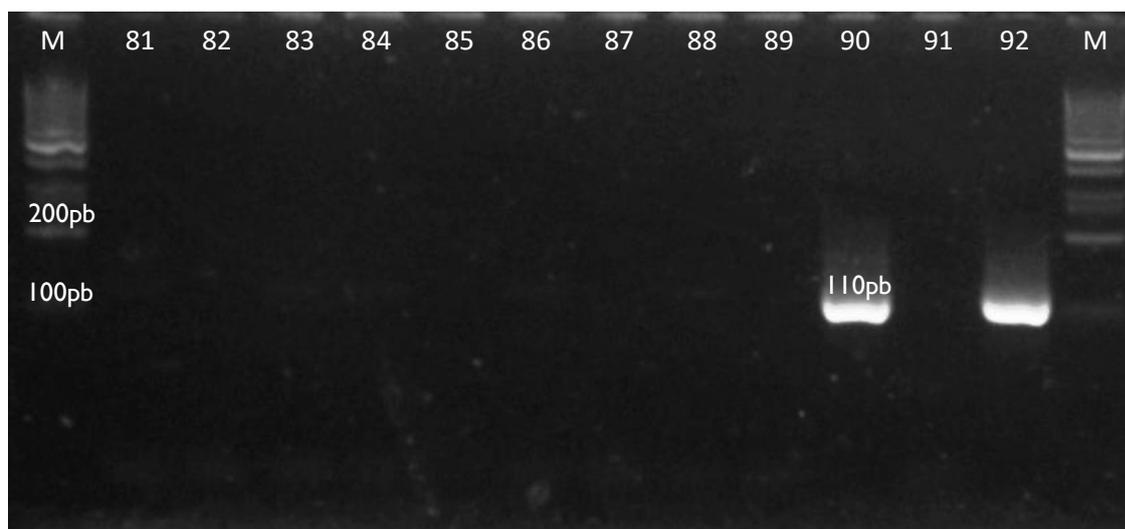


Figura 44 – Amplificação por PCR, para o gene *astA*, de ADN extraído por fervura, a partir de estirpes isoladas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 1 – ADN da estirpe B1 (1 pick-up em 250µL de água), 2 – ADN da estirpe B2, 3 – ADN da estirpe B3, 4 – ADN da estirpe B4, 5 – ADN da estirpe B5, 6 – ADN da estirpe B6, 7 – ADN da estirpe B7, 8 – ADN da estirpe B8, 9 – ADN da estirpe B9, 10 – ADN da estirpe B10, 11 – Branco (água estéril), 12 – Controlo positivo (D3509E), 21 – ADN da estirpe E1, 22 – ADN da estirpe E2, 23 – ADN da estirpe E3, 24 – ADN da estirpe E4, 25 – ADN da estirpe E5, 26 – ADN da estirpe E6, 27 – ADN da estirpe E7, 28 – ADN da estirpe E8, 29 – ADN da estirpe E9, 30 – ADN da estirpe E10, 31 – Branco (água estéril), 32 – Controlo positivo (D3509E), 41 – ADN da estirpe F1, 42 – ADN da estirpe F2, 43 – ADN da estirpe F3, 44 – ADN da estirpe F4, 45 – ADN da estirpe F5, 46 – ADN da estirpe F6, 47 – ADN da estirpe F7, 48 – ADN da estirpe F8, 49 – ADN da estirpe F9, 50 – ADN da estirpe F10, 51 – Branco (água estéril), 52 – Controlo positivo (D3509E), 61 – ADN da estirpe G1, 62 – ADN da estirpe G2, 63 – ADN da estirpe G3, 64 – ADN da estirpe G4, 65 – ADN da estirpe G5, 66 – ADN da estirpe G6, 67 – ADN da estirpe G7, 68 – ADN da estirpe G8, 69 – ADN da estirpe G9, 70 – ADN da estirpe G10, 71 – Branco (água estéril), 72 – Controlo positivo (D3509E), 81 – ADN da estirpe H1, 82 – ADN da estirpe H2, 83 – ADN da estirpe H3, 84 – ADN da estirpe H4, 85 – ADN da estirpe H5, 86 – ADN da estirpe H6, 87 – ADN da estirpe H7, 88 – ADN da estirpe H8, 89 – ADN da estirpe H9, 90 – ADN da estirpe H10, 91 – Branco (água estéril), 92 – Controlo positivo (D3509E), 101 – ADN da estirpe I1, 102 – ADN da estirpe I2, 103 – ADN da estirpe I3, 104 – ADN da estirpe I4, 105 – ADN da estirpe I5, 106 – ADN da estirpe I6, 107 – ADN da estirpe I7, 108 – ADN da estirpe I8, 109 – ADN da estirpe I9, 110 – ADN da estirpe I10, 111 – Branco (água estéril), 112 – Controlo positivo (D3509E)

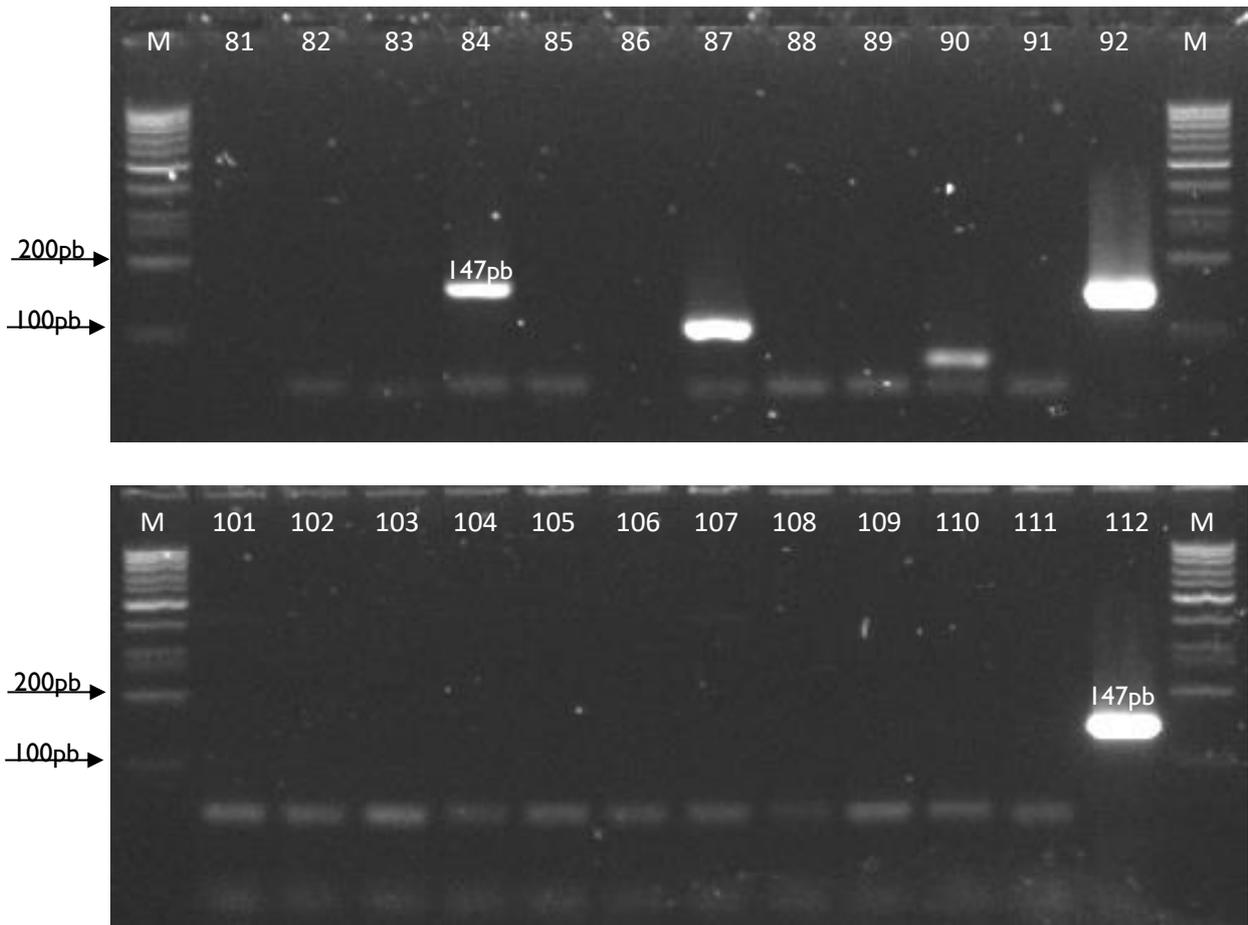


Figura 45 – Amplificação por PCR, para o gene *estA*, de ADN extraído por fervura, a partir de estirpes isoladas

Legenda: M – Marcador 100 bp (DNA Ladder 100bp Bioron), 81 – ADN da estirpe H1, 82 – ADN da estirpe H2, 83 – ADN da estirpe H3, 84 – ADN da estirpe H4, 85 – ADN da estirpe H5, 86 – ADN da estirpe H6, 87 – ADN da estirpe H7, 88 – ADN da estirpe H8, 89 – ADN da estirpe H9, 90 – ADN da estirpe H10, 91 – Branco (água estéril), 92 – Controlo positivo (LMV_E_38), 101 – ADN da estirpe J1 (1 pick-up em 250µL de água), 102 – ADN da estirpe J2, 103 – ADN da estirpe J3, 104 – ADN da estirpe J4, 105 – ADN da estirpe J5, 106 – ADN da estirpe J6, 107 – ADN da estirpe J7, 108 – ADN da estirpe J8, 109 – ADN da estirpe J9, 110 – ADN da estirpe J10, 111 – Branco (água estéril), 112 – Controlo positivo (LMV_E_38).

4.4. Resultados da sequenciação dos produtos da PCR

Após a obtenção destes resultados positivos através da PCR, utilizou-se a sequenciação para confirmar se as estirpes que amplificaram seriam realmente positivas para os genes em questão e para determinar se, no caso das positivas para o gene *astA*, a estirpe era a mesma.

Os resultados obtidos foram os apresentados na tabela abaixo (Tabela 37).

Tabela 37 – Resultados obtidos na sequenciação dos produtos amplificados em estirpes-amostras positivas

Estirpe	Sequência inserida no BLAST	Designação	Percent Identify
B3	GTTATGTATCGTACATATG GTGCGCAACAGCTTACGCT TCGTGTCATGGAAGGACTA CAAAGCCGTCCTACT	<i>Escherichia coli</i> EP300a astA gene for heat-stable enterotoxin I, partial cds	94,29%
E1	TGANCGAAGCGCAGGCTG TTGCGCACCATATGCACGA TGCATAACTGGATGCGGGC CTTCGGATATACTGTGTTG ATGGCATA	<i>Escherichia coli</i> strain FC6821 enteroaggregative heat-stable enterotoxin A (astA) gene, partial cds	100%
E9	CTTCNTGANCGAAGCGCA GGCTGTTGCGCACCATATG CACGATGCATAACTGGATG CGGGCCTTCGGATATACTG TGTTGATGGCATA	<i>Escherichia coli</i> strain 322/EC enteroaggregative heat-stable enterotoxin I (astA) gene, complete cds	100%
F10	ANCGAAGCGCAGGCTGTT GCGCACCATATGCACGATG CATAACTGGATGCGGGCCT TCGGATATACTGTGTTGAT GGCATA	<i>Escherichia coli</i> strain 322/EC enteroaggregative heat-stable enterotoxin I (astA) gene, complete cds	100%
H10	CGAAGCGCAGGCTGTTGC GCACCATATGCACGATGCA TAACTGGATGCGGGCCTTC GGATATACTGTGTTGATGG CATA	<i>Escherichia coli</i> strain 322/EC enteroaggregative heat-stable enterotoxin I (astA) gene, complete cds	100%
I5	CATCCAGTTATGCATCGTG CATATGGTGCAGCAACAGTC TGCGCTTCGTGTCATGGAA GACTACAAAGCCGTCCTACT CGCA	<i>Escherichia coli</i> strain ECOR 32 plasmid heat-stable enterotoxin I (astA) gene, complete cds	100%
H4	ACAACATTAGACTAAAA AGTGTAATGTTGAAAAGG CAACAGTGAAAAAAATCA GAAAATATGAACAACACAT TTTACTGCTGTGAACTTTGT TGTAATCCTGCTCTGTACC GGGA	<i>Escherichia coli</i> O136:H12 heat-stable enterotoxin ST- la gene, partial cds	96,33%

Após a análise dos resultados obtidos na sequenciação, pode-se concluir que das 7 estirpes positivas, identificaram-se 4 estirpes distintas de *E. coli* enteroagregativa, que possuem o gene *astA*, e uma estirpe correspondente a uma *E. coli* que contém o gene *estA*, característico da toxina termoestável de *E. coli* enterotoxigénica.

As estirpes B3, E1, E9, F10, H10 e I5 são estirpes de *E. coli* enteroagregativa com percentagens de identificação de 100%, à exceção da estirpe B3 que apresenta uma percentagem de identificação de 94,29%. Tendo em conta os resultados obtidos na sequenciação, pode-se afirmar que as estirpes E9, F10 e H10 têm homologia com a mesma estirpe: *Escherichia coli* strain 322/EC enteroagregative heat-stable enterotoxin I (*astA*) gene, complete cds.

A estirpe H4 corresponde a uma estirpe de *E. coli* com 96,33% de percentagem de identificação para o gene *estA*.

4.5. Origem alimentar das estirpes

Do total das 100 estirpes estudadas, foi possível, em 7% delas, encontrar genes característicos de virulência de dois patótipos, EAEC e ETEC, sendo que o gene mais frequentemente detetado foi o *astA* (6%), codificador da toxina termoestável característica do patótipo EAEC.

Para as estirpes EAEC e ETEC foi verificado de que alimentos provinham, o que se encontra discriminado na tabela 38.

Tabela 38 – Relação entre as estirpes positivas e o género alimentício

Patótipo	Gene de virulência que apresenta	Estirpe	Alimento
EAEC	<i>astA</i>	B3	Courgete
		E1	Salada
		E9	Cenoura
		F10	Salada mista (alface, tomate, milho e cenoura)
		H10	Acompanhamento de carne à portuguesa (ervilhas, salsichas, cogumelos e pimentos morrone)
		I5	Salada de alface e tomate
ETEC	<i>estA</i>	H4	Tarte de bolo com mousse e coco

A análise da tabela mostra que, das 41 estirpes isoladas de alimentos prontos a consumir que continham hortícolas ou frutas cruas, foi possível detetar genes de virulência característicos de EAEC em 12% (n=5) destas. Foi possível detetar, em 5% (n=2) das 40 estirpes referentes a alimentos totalmente cozinhados, genes de virulência característicos de

EAEC e de ETEC. Relativamente às 19 estirpes correspondentes a esfregaços, não foi possível, em nenhuma delas, detetar nenhum dos genes de virulência pesquisados.

Como se pode observar, as estirpes onde foi possível detetar genes de virulência correspondem a alimentos crus ou alimentos que podem ter sido manipulados após o processamento, o que é favorável para que ocorra contaminação, pelo que é imprescindível uma maior consciencialização e educação dos manipuladores de alimentos face à necessidade de cumprir as boas práticas de higiene, dando especial relevância à higienização das mãos. Por outro lado, a necessidade de fomentar as boas práticas agrícolas e a lavagem eficiente dos alimentos crus é altamente recomendada (WHO, 2018).

Tendo em conta que o principal reservatório da EAEC são os humanos (Croxen *et al.*, 2013), sugere que a contaminação dos alimentos onde foi detetado o gene *astA* pode ter ocorrido aquando do seu cultivo, através, por exemplo, da rega com água contaminada por fezes humanas.

Contudo, a percentagem de *E. coli* enteropatogénicas nesta amostragem foi relativamente baixa, quando comparada com os países da América do Sul ou do continente africano, onde EAEC é bastante comum (Croxen *et al.*, 2013) ou comparando com a maioria dos países subdesenvolvidos onde ETEC é uma estirpe endémica (Meng *et al.*, 2007).

Capítulo V

Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1. Conclusões

O presente trabalho teve como principal objetivo a montagem de um protocolo para a deteção de genes de virulência específicos de estirpes de *E. coli* enteropatogénicas isoladas de diversos géneros alimentícios e de ambientes de produção alimentar. Durante o período de realização da parte experimental do Mestrado (9 meses), foi possível otimizar as condições para a realização da PCR em 10 dos 11 genes de virulência, sendo que foi possível otimizar PCR multiplex para apenas dois deles (genes *stx1* e *stx2*), o que é de enorme importância visto codificarem para a presença da Shiga toxina, que é geralmente produzida por estirpes do patotipo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Foi ainda possível otimizar a extração de ADN para pools de 10 isolados, de forma a diminuir o tempo de deteção e aumentar a produtividade do ensaio. Os protocolos otimizados encontram-se descritos nas tabelas 33, 34 e 35, presentes no Capítulo IV – Resultados e Discussão.

Outro objetivo do trabalho foi testar 100 estirpes de *E. coli* oriundas do banco de estirpes do INSA e verificar a que patotipos os géneros alimentícios estavam associados. Das estirpes onde foram detetadas *E. coli* enteropatogénicas (n=7), 71% (n=5) correspondiam a produtos hortícolas consumidos crus.

Após análise, encontrou-se o gene *estA*, característico da *E. coli* enterotoxigénica, em 1% delas e em 6% delas detetou-se o gene *astA*, característico da *E. coli* enteroagregativa e que codifica a toxina enteroagregativa.

Como se pode verificar pela análise da origem alimentar das estirpes, a manipulação afeta a Segurança Alimentar visto que os talheres, superfícies, etc., como normalmente são higienizados em máquinas com detergentes ou em instalações industriais que devem seguir regras de limpeza mais rigorosas, das estirpes analisadas referente a esfregaços de superfícies em nenhuma foi possível detetar genes de virulência, o que sugere que é mesmo o Homem que contamina os alimentos que podem vir a ser consumidos crus e que podem vir a constituírem um risco para a Saúde Pública, especialmente para grupos de risco como crianças de tenra idade, idosos e grávidas.

O facto dos resultados sugerirem, apesar de tudo, uma boa higienização na manipulação dos alimentos, uma vez que a percentagem de estirpes positivas foi baixa, não se deve relegar este tópico e deve-se continuar a alertar os manipuladores de alimentos para os

riscos de contaminação de alimentos ingeridos crus com bactérias de origem fecal e deve-se continuar a estudar a presença de patótipos de *E. coli* em géneros alimentícios, as suas vias de transmissão e os seus reservatórios de forma a melhorar a Segurança Alimentar.

5.2. Perspetivas futuras

Uma vez que o objetivo principal não foi obtido, na sua totalidade, com sucesso, perspetiva-se que no futuro, através do desenho de novos primers ou da aquisição de novas estirpes controlo positivo, poder-se-ia, com mais tempo, otimizar as condições da PCR e do perfil térmico a usar no termociclador para o gene *bfpA* e, posteriormente, montar um PCR multiplex para todos os genes.

Além destes genes, o estudo desenvolvido nesta dissertação pode ser impulsionador para a pesquisa de outros genes indicadores de virulência de outras *E. coli* patogénicas, como a *E. coli* de aderência difusa (DAEC) ou a *E. coli* aderente-invasiva (AIEC).

Poder-se-ia, também, pesquisar genes indicadores de virulência em caldos de enriquecimento por PCR em tempo real, visto que este apresenta uma maior sensibilidade na pesquisa e maior eficácia na deteção de estirpes.

A realização da sequenciação total de estirpes isoladas poderia permitir averiguar reservatórios, modos de transmissão e resistências e determinar características fenotípicas que auxiliariam a identificação e o isolamento de estirpes.

Por outro lado, a confirmação dos resultados positivos obtidos por PCR, para qualquer um destes genes, poderia necessitar de ensaios de citotoxicidade. A análise da citotoxicidade é importante pois permite avaliar o efeito da presença de um determinado gene de virulência sobre as células do hospedeiro, uma vez que a presença de um gene não garante a produção da toxina.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- ALIKHANI, M. Y., MIRSALEHIAN, A. e ASLANI, M. M. (2006). **Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea.** *Journal of Medical Microbiology*. 55: 1159-1163.
- ALLOCATI, N., MASULLI, M., ALEXEYEV, M. F. e ILIO, C. D. (2013). ***Escherichia coli* in Europe: an overview.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10:6235-6254.
- ANDRADE, F. B. (2013). *Padronização e Avaliação de PCR Multiplex para o diagnóstico de Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica.* Tese de Mestrado em Biotecnologia. USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo. 40 pp.
- ARANDA, K. R. S., FAGUNDES-NETO, U. e SCALET SJY, I. C. C. (2004). **Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheogenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp.** *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 5849-5853.
- BAPTISTA, P. e ANTUNES, C. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração.* 1ª edição, vol. II. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Guimarães.
- BLUM, A. (2014). **Reed biologists investigate a gut - wrenching mystery** [Em linha]. Washington: Chris Lydgate, Vol. 92, Março de 2013. [Consult. 4 feb. 2019]. Disponível em: https://www.reed.edu/reed_magazine/march2013/articles/features/mellies.html.
- BOISEN, N., SCHEUTZ, F., RASKO, D. A., REDMAN, J. C., PERSSON, S., SIMON, J., KOTLOFF, K. L., LEVINE, M. M., SOW, S., TAMBOURA, B., TOURE, A., MALLE, D., PANCHALINGAM, S., KROGFELT, K. A. e NATARO, J. P. (2012). **Genomic Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* from Children in Mali.** *The Journal of Infectious Diseases*. 205: 431-444.
- BOISEN, N., STRUVE, C., SCHEUTZ, F., KROGFELT, K. A. e NATARO, J. P. (2008). **New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF Family.** *Infection and Immunity*. 76: 3281-3292.
- BUSH, L. M. (2016). **Infeções por *Escherichia coli*.** EUA: Manual MDS [Consult. 17 abr. 2019] Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas/infec%C3%A7%C3%B5es-por-escherichia-coli>

- CAMPOS, J., GIL, J., MOURÃO, J., PEIXE, L., ANTUNES, P. (2015). **Ready-to-eat street-vended food as a potencial vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal.** *International Journal of Food Microbiology*. 206: 1-6.
- COLEMAN, W. B. e TSONGALIS, G. J. (2006). The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. pp. 47-55.
- CROXEN, M. A., LAW, R. J., SCHOLZ, R., KEENEY, K. M., WLODARSKA, M., FINLAY, B. B. (2013). **Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli.** *Clinical Microbiology Reviews*. 26:822-880.
- DUARTE, C. M. P. C. (2010). *Análise do Sistema de Segurança Alimentar de uma Indústria de Produtos da Pesca Congelados*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 116 pp.
- ECDC (2014). Fourth external quality assessment scheme for typing of verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC). ECDC Technical Report.
- ECDC, NCEZID e DFWED (2019a). **Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Flour.** EUA: 2019 Outbreaks [Consult. 26 jun. 2019] Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/flour-05-19/index.html>
- ECDC, NCEZID e DFWED (2019b). **Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Beef.** EUA: 2019 Outbreaks [Consult. 26 jun. 2019] Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o103-04-19/index.html>
- EFSA (2013). **Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment.** *EFSA Journal*. 11 (4): 3138.
- EFSA (2015). **Public health risks associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen.** *EFSA Journal*. 13 (12): 4330.
- EFSA e ECDC (2018). **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.** *EFSA Journal*. 16(12): 5500.
- EU REFERENCE LABORATORY FOR *E. COLI* (2013). *Detection of Enteroinvasive Escherichia coli in food by Real Time PCR amplification of the ipaH gene.*

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2012). Pathogenic *Escherichia coli* Group. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2^a ed.
- FUJIOKA, M., OTOMO, Y. e AHSAN, C. R. (2013). **A novel single-step multiplex Polymerase chain Reaction assay for the detection of Diarrheogenic *Escherichia coli***. *Journal of Microbiological Methods*. 92: 289-292.
- GARIBYAN, L. e AVASHIA, N. (2013). **Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)**. *National Institutes of Health*. 133:1-8.
- GE, B., ZHAO, S., HALL, R. e MENG, J. (2002). **A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli***. *Microbes and Infection*. 4: 285-290.
- GUERREIRO, S. C. A. (2012). Análise molecular e fenotípica da virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de alimentos prontos-a-comer (RTE). Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 126 pp.
- GYLES, C. L. (2007). **Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview**. *American Society of Animal Science*. 85: E45-E62.
- HUASAI, S., CHEN, A., WANG, C. LI, Y. e TONGRIGE, B. (2012). **Occurrence and characterization of virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cows in Inner Mongolia, China**. *Brazilian Journal of Microbiology*. 528-534.
- ISO 13136:2012 – Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.
- JENSEN, B. H., OLSEN, K. E. P., STRUVE, C., KROGFELT, K. A. e PETERSON, A. M. (2014). **Epidemiology and Clinical Manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli***. *Clinical Microbiology Reviews*. 27: 614-630.
- JOSHI, M. e DESHPANDE, J. D. (2011). **Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application**. *International Journal of Biomedical Research*. 2:81-97.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P. e MOBLEY, H. L. T. (2004). **Pathogenic *Escherichia coli***. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140.

- KLEIN, A. L., SCHÜROFF, P. A. e PELAYO, J. S. (2015). **Caracterização de *Escherichia coli* típica e atípica em cepas isoladas de amostras de água para consumo humano de Londrina, PR.** *XXIV Encontro Annual de Iniciação Científica.*
- LI, S., QU, Y., HU, H. e SHI, Y. (2012). **Comparison of extended spectrum - lactamases-producing *Escherichia coli* with non-ESBLs-producing *E. coli*: drug-resistance and virulence.** *World Journal of Emergency Medicine.* 3(3): 208-212.
- LOURENÇO, A. I. P. (2015). *Estudo de *Listeria monocytogenes* e *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) em leite cru de pequenos ruminantes e avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado.* Tese de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco. 92 pp.
- MENG, J., DOYLE, M. P., ZHAO, T. e ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P. e BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**, 3ª ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, cap. 12, p. 249-269, 2007.
- MOHAMMADEN, M., GOUDARZI, H., DABIRI, H. e FALLAH, F. (2017). **Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea Among Iranian Infants.** *Pediatric Infections Research Center.* 5(1): 1-5.
- NATARO, J. P. e KAPER, J. B. (1998). **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology Reviews,* 11: 142-201.
- NATARO, J. P., STEINER, T., e GUERRANT, R. L. (1998). **Enterotoxigenic *Escherichia coli*.** *Emerging Infectious Diseases.* 4(2): 251-261.
- NAVARRO-GARCIA, F. e ELIAS, W. P. (2016). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EAEC). In: TORRES, A. G. ***Escherichia coli* in the Americas**, Springer, Cham, pp. 27-57, 2016.
- NGUYEN, T. V., VAN, P. L., HUY, C. L., GIA, K. N., e WEINTRAUB, A. (2005). **Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam.** *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 755-760.
- NÜESCH-INDERBINEN, M. T., HOFER, E., HÄCHLER, H., BEUTIN, L. e STEPHAN, R. (2013). **Characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from healthy carriers and from patients with diarrhoea.** *Journal of Medical Microbiology.* 62: 1828-1834.

- PARADELA, A. M. B. M. (2008). *Disseminação de genes de resistência em estirpes clínicas de Escherichia coli*. Tese de Mestrado em Microbiologia Molecular. Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Aveiro. 91 pp.
- PATTON, A. W. e PATTON, J. C. (1998). **Detection and Characterization of Shiga Toxigenic Escherichia coli by Using Multiplex PCR Assays for stx₁, stx₂, eaeA, Enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfb_{O111}, and rfb_{O157}**. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 598-602.
- PATTON, A. W. e PATTON, J. C. (1999). **Direct Detection of Shiga Toxigenic Escherichia coli Strains Belonging to Serogroups O111, O157, and O113 by Multiplex PCR**. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3362-3365.
- PETRI, W. A., MILLER, M., BINDER, H., LEVINE, M. M., DILINGHAN, R. e GUERRANT, R. L. (2008). **Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development**. *The Journal of Clinical Investigation*. 118: 1277-1290.
- PINA, E. C. S. (2012). *Estudo da suscetibilidade a antibióticos de enterobactérias isoladas nos Hospitais da Universidade de Coimbra: deteção laboratorial de -lactamases*. Tese de Mestrado em Farmacologia Aplicada. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra. 63 pp.
- RODRIGUES, A. M. G. (2014). *Patogénese das Infeções Entéricas por Escherichia coli*. Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto. 72 pp.
- ROSS, T., RATKOWSKY, D. A., MELLEFONT, L. A. e MCMEEKIN, T. A. (2002). **Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of Escherichia coli**. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 33-43.
- SILVEIRA, L., MARQUES, A. e MACHADO, J. (2013). **Patotipos de Escherichia coli associados a infeções entéricas entre 2002-2012**. *Boletim Epidemiológico Observações*. pp. 20-22.
- TEIXEIRA, N. B., ROJAS, T. C. G., SILVEIRA, W. D., MATHEUS-GUIMARÃES, C., SILVA, N. P. e SCALETSKY, I. C. A. (2015). **Genetic analysis of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within**

the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. *BMC Microbiology.* 15:200.

VASCONCELLOS, F. M. (2009). *Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Stf.* Tese de Mestrado em Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 97 pp.

WILLSHAW, G., CHEASTY, T. e SMITH, H. (2000). *Escherichia coli.* Em: Lund, B., Baird-Parker, T. e Gould, G., **The Microbiological Safety and Quality of Food**, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. Vol. II, pp. 1136-1177.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety.** Genebra: WHO, 2017. [Consult. 28 mai. 2019] Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **E. coli.** Genebra: WHO, Fevereiro de 2018. [Consult. 2 abr. 2019] Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.

Anexo

Anexo I

Constituição do meio Tryptone-Bile-X-Glucuronate (TBX) agar

Em 1L de meio tem-se:

Componente	Quantidade
Triptona	20,0 g
Sais biliares	1,5 g
BCIG (5-bromo-4-cloro-3- indol β -D-glucuronato)	75,0 mg
Agar bacteriológico	9,0 g
pH (a 25 °C) = 7,2 \pm 0,2	