

PESQUISA DO GENE *STX1* EM ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE CARCAÇAS BOVINAS

ANDRIELLE DIAS DA CUNHA¹; YTAIARA LIMA PEREIRA²; ERIC OSSUGUI³;
ALESSANDRA ALMEIDA DA SILVA⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵, GRA-
CIELA VOLZ LOPES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – andriellecunha@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – ytaiaralima@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – eric.ossugui@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – allealmeida4@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli está presente no trato intestinal dos animais e do homem, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro e desempenhando um importante papel na fisiologia intestinal. No entanto, algumas estirpes são patogênicas, promovendo desde diarreia até doenças mais graves em seus hospedeiros (PALETTA et al., 2019). *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) é também conhecida como *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC), devido ao efeito citopático que causa em células Vero (KAPER & NATARO, 2004). A patogenicidade de STEC é mediada pela produção da toxina de Shiga (Stx), codificada pelos genes *stx1* e *stx2* (CASTRO et al., 2019). A produção de Stx é necessária para causar os sintomas, bem como para as complicações potencialmente fatais da infecção por STEC (PATON & PATON., 1998). As cepas pertencentes ao sorotipo O157:H7 de STEC são frequentemente associadas aos surtos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) e são consideradas como de maior importância para a saúde pública (FITZGERALD et al., 2021).

Como *E. coli* é um micro-organismo que está presente no trato intestinal de animais de sangue quente, sua eliminação ocorre pelas fezes (GONZALEZ et al., 2019). O tecido muscular dos animais é considerado, em situações normais, estéril e livre de contaminação por micro-organismos. Porém, após as operações realizadas durante o processo de abate, a carcaça pode apresentar contaminação. Operações de abate como a esfolagem e evisceração, através do contato acidental com couro ou com o conteúdo intestinal, podem propiciar a contaminação da carcaça (MATOS et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi isolar *E. coli* de fezes e carcaças bovinas, provenientes de abatedouros frigoríficos de Pelotas/RS, bem como investigar a presença do gene que codifica para a produção da toxina de Shiga Stx1.

2. METODOLOGIA

As amostras foram coletadas em dois abatedouros frigoríficos (A e B) inspecionados pela Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul, na cidade de Pelotas/RS. Foram realizadas sete visitas aos estabelecimentos, durante o período de novembro de 2021 a julho de 2022. Setenta carcaças foram amostradas em quatro pontos distintos do abate: couro após a sangria (P1),

fezes antes da oclusão do reto (P2), carcaça após evisceração (P3) e carcaça após lavagem final (P4), totalizando 280 amostras. A amostragem foi feita na superfície das carcaças em uma área de 400 cm², com auxílio de esponja vegetal previamente hidratada com solução salina peptonada (0,85% e 0,1%). As fezes foram coletadas com swab esterilizado e transportadas em meio Cary Blair (ABSORVE-CRAL[®]).

Para detecção de STEC foi utilizado o método ISO 13.136, com modificações. As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey Sorbitol (OXOID[®]) suplementado com cefixima (0,05 mg/mL) e telurito (2,5 mg/mL) (CT-SMAC) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas foram examinadas e colônias fermentadoras e não fermentadoras de sorbitol foram selecionadas para identificação bioquímica através dos testes de Citrato, Indol, Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP).

Os isolados confirmados como *E. coli* nos testes bioquímicos foram submetidos à extração de DNA genômico e análise de PCR, para identificação do gene *stx1*, o qual codifica para produção da toxina de Shiga 1 (Stx1). A extração de DNA foi feita por fenol clorofórmio, como descrito por Sambrook (2001), com modificações. A PCR foi realizada com volume final de 25 µL, compreendendo 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega[®]), 1,0 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 pmol/ µL), 2,0 µL de DNA e água ultrapura até completar o volume, em termociclador PTC-100[®]. A sequência dos *primers* utilizados foi: FW-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC e RV-AGAACGCCCACTGAGATCATC (PATON & PATON, 1998). As condições da PCR para o gene *stx1* consistiram em desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 0,5X, contendo corante gel Red[®]. O tempo da corrida foi de 1 hora e 55 minutos. O tamanho do *amplicon* esperado foi de 180 pb.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 70 carcaças bovinas, das quais *E. coli* presuntiva de STEC foi isolada em 42, (60%). Destas, 11 (15,7%) foram no couro após a sangria (P1), 29 (41,4%) em fezes após a oclusão do reto (P2), cinco (7,1%) na carcaça após a evisceração (P3) e cinco (7,1%) na carcaça após a lavagem final (P4). Três carcaças apresentaram *E. coli* no couro e nas fezes, concomitantemente, uma nas fezes e após a evisceração, uma no couro e após a lavagem, e uma no couro, nas fezes e após a evisceração (Tabela 1).

Tabela 1. Isolamento de *Escherichia coli* presuntiva de STEC em fezes e carcaças bovinas abatidas em Pelotas/RS

Abatedouro-Frigorífico	Coleta	Número de carcaças positivas (%)			
		Couro após sangria (P1)	Fezes antes da oclusão do reto (P2)	Carcaça após evisceração (P3)	Carcaça após lavagem final (P4)
A	1º	0	2	0	0
A	2º	3	3	1	1
A	3º	4	7	0	0
A	4º	4	4	2	4
A	5º	0	1	0	0
B	6º	0	10	0	0
B	7º	0	2	2	0
Total		11 (15,7%)	29 (41,4%)	5 (7,1%)	5 (7,1%)

Loiko et al. (2016) identificaram o couro bovino logo após a sangria como um dos pontos com maior contaminação por *E. coli* O157:H7, com 77,27% de positividade, seguido da carcaça antes da evisceração (18,18%) e carcaça logo após a divisão em meias carcaças (4,55%). Sereno (2021) obteve o maior percentual de contaminação por *E. coli* no couro (12,8%) e nas fezes (87,2%), o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Alguns autores consideram a esfola e a evisceração como os pontos com maior contaminação por micro-organismos (CHAGNOT et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Como *E. coli* é um micro-organismo presente no trato intestinal dos bovinos e a eliminação da bactéria ocorre pelas fezes dos animais, é importante monitorar sua presença durante o processo de abate, especialmente estirpes patogênicas, como STEC (PIGATTO, 2008). Os abatedouros de bovinos devem fazer o controle microbiológico específico para STEC, determinada pela Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018), com o objetivo de reduzir a ocorrência desse micro-organismo.

No total, 100 isolados bacterianos, confirmados bioquimicamente como *E. coli*, foram submetidos a PCR para investigação do gene *stx1*. Através da PCR foi possível verificar que nenhum dos isolados apresentou o gene *stx1*. Segundo Gomes et al. (2016), o principal fator de virulência de STEC é a produção da toxina de Shiga (Stx), a qual é codificada pelos genes *stx1* ou *stx2*. Além disso, a patogênese inclui a adesão às células epiteliais do intestino através da proteína intimina, codificada pelo gene *eae*. Em estudos anteriores foi observada a frequência de 18,2% (4/22) para o gene *stx1* e 77,3% para o gene *stx2* em isolados de *E. coli* provenientes de carcaças bovinas no Rio Grande do Sul (LOIKO et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que *E. coli* foi mais frequente no couro após a sangria e nas fezes antes da oclusão do reto durante o abate de bovinos em dois abatedouros-frigoríficos de Pelotas/RS, porém o gene *stx1* não foi detectado entre os isolados obtidos. No entanto, salienta-se a importância da pesquisa adicional dos genes *stx2* e *eae* para confirmação de STEC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO V.L., FIGUEIREDO E.E.S., STANFORD K., MCALLISTER T., CONTEJUNIOR C.A. Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* in Brazil: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 5, n. 7, 2019.
- FITZGERALD S.F., LUPOLOVA N., SHAABAN S., DALLMAN T.J., GREIG D., ALLISON L., TONGUE S.C., EVANS J., HENRY M.K., MCNEILLY T.N., BONO J.L., GALLY D.L. Genome structural variation in *Escherichia coli* O157:H7. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 11, 2021.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GONZALEZ M.G.A., CERQUEIRA M.F.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 6, n. 128, p. 1568-1582, 2019.

- ISO. Horizontal method for the detection of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups, 13136:2012. ISO, 2012, p. 23.
- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2. p. 123-140, 2004.
- LOIKO M.R., DE PAULA C.M., LANGONE A.C., RODRIGUES R.Q., CIBULSKI S., RODRIGUES R.D.E.O., CAMARGO A.C., NERO L.A., MAYER F.Q., TONDO E.C. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. **Meat Science**, v. 116, p. 193-200, 2016.
- MATOS A.V.R., NUNES L.B.S., VIANNA C., SPINA T.L.B., ZUIM C.V., POSSEBON F.S., XAVIER D.M., FERRAZ M.C., PINTO J.P.A.N. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas para exportação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 65, p. 981–988, 2013.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. MAPA. **Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018, que estabelece o Controle Microbiológico em Carcaça de Suínos e em Carcaça e Carne de Bovinos em abatedouros Frigoríficos**. Diário Oficial, 2018.
- Ministerio da Saúde. **Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil**. Digital, jan. 2022. Especiais. Acessado em 02 agos. 2022. Online. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/copy_of_apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf
- PALETTA A.C.C., CASTRO V.S., CONTE-JUNIOR C.A. Shiga Toxin-Producing and Enteroaggregative *Escherichia coli* in Animal, Foods, and Humans: Pathogenicity Mechanisms, Detection Methods, and Epidemiology. **Current Microbiology**, v. 4, n. 77, p. 612-620, 2019.
- PATON A.W., PATON J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}, *Journal of Clinical Microbiology* v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.
- PEREIRA, G, J. **Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira oeste do sul do Brasil com Argentina e Uruguai**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.
- PIGATTO C. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho. São Paulo, 2008.
- SAMBROK J, RUSSEL D. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 30 ed, Nova York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2021, v. 1, cap. 6.
- SANTOS, E.C.C. et al. Evaluation of the sanitary conditions of head meat, esophagus, diaphragm meat, and boning scrap processing. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 1-4, 2017.
- SERENO, J.M. **Influência do sistema de produção de carne bovina na distribuição de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* e presença de cepas patogênicas de *E. coli***. 2021. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.