

**ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICAS EM  
CARNES BOVINAS**

MARCELLA B. **ORDONHO**<sup>1</sup>; RENATA **BROMBERG**<sup>2</sup>; MÍRIAM G.  
**MARQUEZINE**<sup>3</sup>; LUÍS H. **COSTA**<sup>4</sup>; LUCIANA **MIYAGUSKU**<sup>5</sup>

**Nº 12259**

**RESUMO**

*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) constitui-se em um importante grupo de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, em sua maioria por produtos derivados de carne bovina e está associada a quadros de diarreias severas e sanguinolentas. O gado bovino, geralmente saudável, é o principal reservatório de STEC. Apesar de pouco divulgada, a ocorrência de casos recorrentes de pessoas afetadas por esse patógeno estimula sua procura na cadeia de alimentos. Neste estudo avaliou-se a ocorrência de STEC em amostras de carnes bovinas provenientes de frigoríficos do estado de São Paulo. Dentre as 118 amostras analisadas não foram detectadas bactérias do grupo STEC.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Biomedicina, VERIS IBTA, Campinas- SP, [ordonhomarcella@gmail.com](mailto:ordonhomarcella@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, CTC/ITAL, Campinas- SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Técnica, CTC/ITAL, Campinas- SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Empresa BioControl Systems, Brasil.

<sup>5</sup> Colaborador: Universidade Federal de Mato Grosso, Campo Grande- MT.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC) is an important group of pathogenic bacteria transmitted by food, in most cases, products derived from beef and it is associated with pictures of bloody and severe diarrhea. Generally, healthy cattle are the main reservoir of STEC. Although little known, the occurrence of recurrent cases of people affected by this pathogen stimulates the search for these bacteria in the food chain. In this study the occurrence of STEC in beef produced in companies from São Paulo State was examined. Among the 118 samples analyzed none STEC was detected.

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é um microrganismo habitante natural da microbiota do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente. É uma bactéria com formato de bastonete Gram negativo, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos (ALTERTHUM & TRABULSI, 2004). Existem vários tipos de *E. coli*, sendo que a maioria não é considerada patogênica ao ser humano. Dentre os 173 sorogrupos de *E. coli* identificados nos últimos 50 anos, aproximadamente 60 são reconhecidos como patogênicos, causadores de doenças no homem ou em animais (DUNCAN & CAMERON, 1994).

As *E. coli* patogênicas ao homem são classificadas de acordo com suas propriedades de virulência, diferenças na epidemiologia e sorogrupos O:H distintos. O antígeno O (Ohne) é determinado pela porção de polissacarídeo do lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) e o H (Hauch) refere-se ao flagelo da bactéria.

Em 1983 foi demonstrada a associação destas bactérias com infecções intestinais, quando então epidemiologistas norte-americanos investigaram dois surtos de diarreia provocados pela ingestão de hambúrgueres. Durante os estudos dos casos, constatou-se que alguns pacientes infectados eram portadores da *E. coli* O157:H7 (ALTERTHUM & TRABULSI, 2004). Na década de 90, as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) emergiram como agentes de extrema importância para a saúde pública, uma vez que foi comprovado que a infecção provocada por estas bactérias podia resultar em danos severos ao homem (DOYLE, 1994). As subclasses das *E. coli* patogênicas denominam-se: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (ALTERTHUM & TRABULSI, 2004).

A *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é um importante patógeno, veiculado por alimentos, que pode causar diarreias severas e sanguinolentas no ser humano, denominadas de Colite Hemorrágica (CH). Em algumas pessoas, a infecção por STEC pode progredir para a Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU) ou o quadro de Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). O gado bovino, geralmente saudável, é o principal reservatório de STEC (GIRARD *et al.*, 2002).

As STEC tornaram-se um grande desafio à saúde pública, pois apresentam um alto grau de infectividade para os seres humanos. As STEC são diferenciadas de outras *E. coli* pela produção de um ou dois tipos de potentes toxinas denominadas Shiga, apresentadas em duas formas, Stx1 e Stx2, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese proteica nas células alvo. Os genes *stx*, que codificam a toxina, estão localizados no genoma de bacteriófagos integrando-se ao cromossomo da célula hospedeira (GYLES, 2006). A presença desses genes em bacteriófagos propicia a capacidade de disseminação entre diferentes cepas e também possibilita a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. As STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* além de outros fatores de virulência relacionados à produção das toxinas.

Embora o sorotipo O157:H7 tenha recebido importância destacada por ter sido o primeiro a ser associado a surtos de doenças (CH, SHU e PTT), outros sorogrupos não-O157 têm igualmente um papel crucial nas infecções por STEC. Estes sorogrupos são pertencem à classe das *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), a qual é considerada um subgrupo das STEC.

A aderência às células intestinais constitui-se em uma característica da infecção por STEC e vem sendo amplamente estudada tanto em cultura de células como *in vivo*. Os padrões de aderência e de interação entre as STEC e as células epiteliais são diferentes entre as STEC *eae*-positivo e *eae*-negativo (GYLES, 2006). As STEC *eae*-positivo produzem uma lesão característica nas células do epitélio intestinal denominada lesão AE (*attaching* e *effacing*). A lesão AE envolve alterações estruturais no epitélio celular e aderência íntima da bactéria à célula hospedeira. Embora a lesão não seja essencial para a ocorrência do quadro de diarreia sanguinolenta e SHU no ser humano, a maioria das linhagens relacionadas a estas síndromes são do tipo *eae*-positivo. Pouco se conhece a respeito da aderência das STEC *eae*-negativo.

Os ruminantes, em especial o gado bovino, constituem-se no maior reservatório de STEC. Desta forma, a infecção humana por este grupo de bactérias é

frequentemente associada à contaminação de alimentos, em especial a carne bovina, ou a água contaminada por fezes de bovinos ou vegetais regados por esta água. A causa mais comum de infecção em pessoas é a ingestão de carnes bovinas subprocessadas termicamente. Os hambúrgueres caseiros ou preparados no ponto de venda são os veículos mais comuns de infecção devido ao processo de fabricação que facilita sua contaminação. Nos últimos anos constatou-se um aumento no envolvimento de outros veículos de transmissão, como: águas da rede pública, verduras e frutas.

Vários surtos e casos esporádicos de problemas de saúde pública relacionados à presença de EHEC vêm sendo relatados na maioria dos países desenvolvidos, como EUA, Japão, Canadá, entre outros. Na América do Sul, vários relatos de doenças relacionadas à EHEC foram registrados na Argentina, que é considerada o país com maior número de casos de SHU no mundo. A grande frequência dessa síndrome é atribuída ao consumo intenso de carnes bovinas (ALTERTHUM & TRABULSI, 2004).

Em 2009, o Departamento de Agricultura e o Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos dos Estados Unidos (USDA-FSIS) investigaram um surto ocasionado por *E. coli* O157:H7 em vários estados americanos ocasionado pelo consumo de carne moída. Dentre as 17 pessoas infectadas, dois pacientes desenvolveram o quadro de SHU, sem ser constatada a ocorrência de mortes (CDC, 2009). Em 2010, o Departamento de Saúde do Minnesota, Estados Unidos, relatou a ocorrência de dois casos de alunos de uma mesma escola que foram hospitalizados com quadro de diarreia sanguinolenta. Atribuiu-se o surto ao consumo de carne de veado processado nas dependências da escola. Estes surtos foram associados à presença dos subtipos STEC O103:H2 e O145:NM (JOSHUA *et al.*, 2012). Em 2011, autoridades agrícolas e de saúde pública do Missouri, Estados Unidos, se associaram a outros estados norte-americanos para investigar um surto de *E. coli* do sorotipo O157:H7 presente em alface. Das 60 pessoas infectadas por essa bactéria dois pacientes desenvolveram a síndrome hemolítico-urêmica, sem que houvessem sido relatados casos letais (CDC, 2011).

Entrou em vigor em 31 de maio de 2012, nos Estados Unidos, um regulamento que determina a implementação de uma verificação rotineira da presença de seis sorotipos de STEC (O26, O45, O103, O111, O121 e O14) em carne bovina crua (de procedência nacional ou importada) proveniente de animais abatidos a partir do dia 4 de junho de 2012 (ESTADOS UNIDOS, 2012). Frente a esta regulamentação torna-se imprescindível o estudo da presença das STEC na cadeia de alimentos, em especial

na carne bovina, visto que existe uma tendência do mercado internacional de solicitar esta verificação de seus fornecedores.

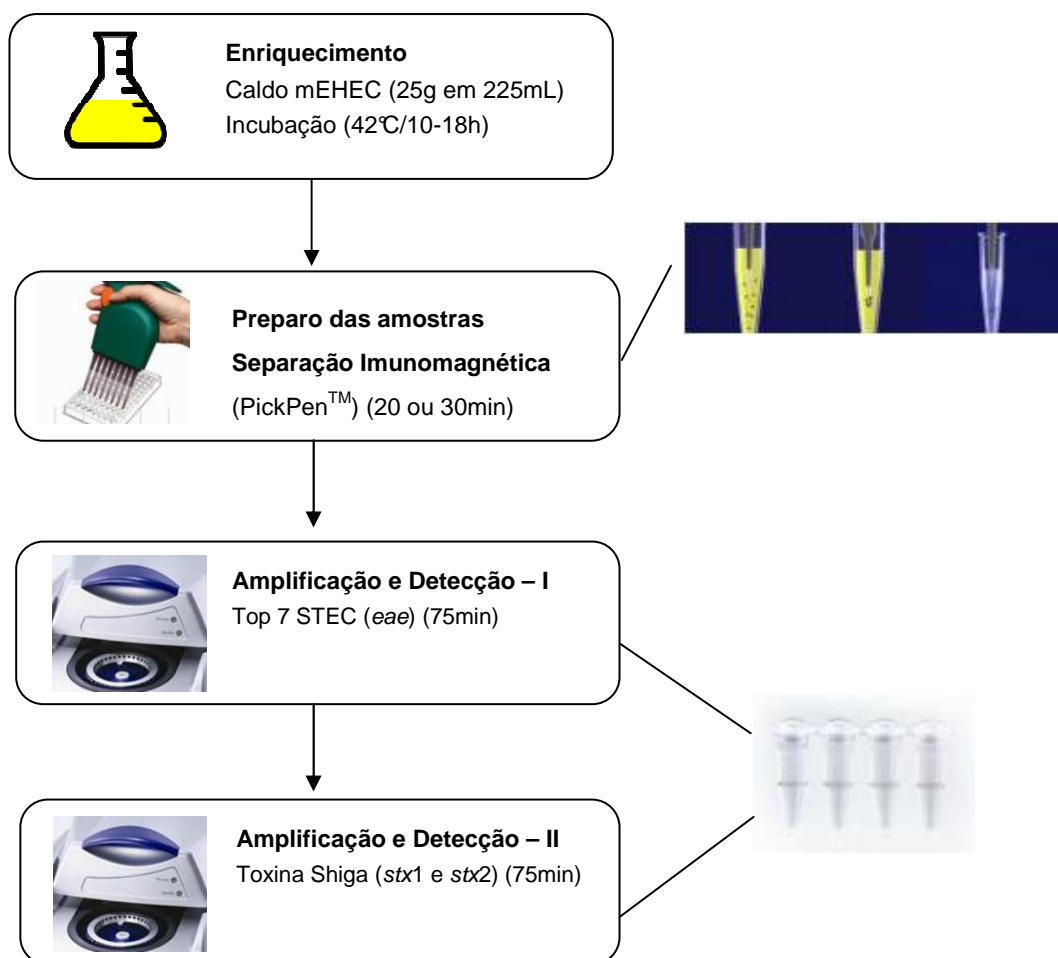
A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo utilizada para a detecção dos sorotipos de *E. coli* do grupo STEC. O PCR consiste em amplificar cópias de DNA *in vitro*, utilizando os elementos básicos de replicação natural do DNA. É um método que se baseia na rápida amplificação de sequências específicas de DNA da célula alvo. A localização das sequências alvo é realizada pelos *primers* (também denominados de oligonucleotídeos ou iniciadores) com 20-24 bases usualmente seletivas o suficiente para localizar um sítio único em um genoma de alta complexidade. Cada uma das novas fitas de DNA estendidas a partir dos *primers* serve como molde para a síntese de uma nova fita, isso garante o aumento exponencial do número de novas fitas. O PCR convencional não apresenta valores quantitativos por isso foi desenvolvido o PCR em tempo real. O PCR em tempo real é uma técnica descrita como quantitativa, pois consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo. As características relevantes do PCR em tempo real são: rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação (GACHON *et al.*, 2004). Esta técnica permite sua utilização em diversas aplicações, tais como: quantificação do número de cópias de transgênicos, resistência a fungicidas, contaminação de alimentos, identificação de organismos geneticamente modificados, detecção e quantificação de patógenos, entre outras (SHAAD *et al.*, 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 118 amostras de três cortes de carne bovina provenientes de seis frigoríficos, distribuídos pelo estado de São Paulo foi analisado neste estudo. As amostras resfriadas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e foram mantidas em temperaturas entre 4°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), até a realização dos ensaios.

O sistema Assurance GDS<sup>®</sup> (Biocontrol, EUA) Top 7 STEC (*eae*) e Toxina Shiga (*stx1* e *stx2*) foi utilizado para a detecção das *E. coli* STEC neste estudo. Constitui-se em um sistema automatizado de amplificação de ácido nucléico para a detecção dos genes *eae*, *stx1* e *stx2* presentes nos sorogrupos O das *E. coli* O103, O111, O121, O145, O26, O45 e O157. O sistema GDS apresenta uma etapa de separação imunomagnética por meio de um pipetador específico PickPen<sup>®</sup>IMS, que isola os microrganismos pertencentes a estes sete sorogrupos O específicos, seguindo-se então para a etapa de análise genética propriamente dita. O

procedimento de detecção da STEC foi realizado conforme recomendações do fabricante, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.



**Figura 1:** Protocolo geral para determinação de *E. coli*: O103, O111, O121, O145, O26, O45 e O157 pelo sistema GDS Top 7 STEC (*eae*) e Toxina Shiga (*stx1* e *stx2*).

## Resultados e Discussão

Os resultados dos testes de detecção dos genes *eae*, *stx1* e *stx2* nas amostras de cortes bovinos resfriados são apresentados na Tabela 1. Considera-se que o uso de protocolos que associam uma etapa de separação imunomagnética para o isolamento de genes de importância para STEC aumentam em pelo menos 100 vezes os níveis de detecção (CHAPMAN *et al.*, 1994). O sistema GDS utilizado neste estudo constitui-se num protocolo que faz uso do recurso da separação imunomagnética para o isolamento dos sorogrupos de STEC O103, O111, O121, O145, O26, O45 e O157. Neste estudo, não foram detectados os referidos genes nas amostras analisadas.

**Tabela 1:** Detecção dos genes *eae*, *stx1* e *stx2* em amostras de cortes bovinos resfriados provenientes de frigoríficos do estado de São Paulo.

| Cortes Cárneos/Procedência        | n* | Top 7 Stec ( <i>eae</i> ) |               | Top 7 Shiga ( <i>stx1</i> e <i>stx2</i> ) |               |
|-----------------------------------|----|---------------------------|---------------|---|---------------|
|                                   |    | Positivas (%)             | Negativas (%) | Positivas (%)                             | Negativas (%) |
| Contra-filé (Frigorífico 1 e 2)   | 54 | 0                         | 100           | 0   | 100           |
| Costela (Frigorífico 2)           | 30 | 0                         | 100           | 0   | 100           |
| Patinho (Frigorífico 3, 4, 5 e 6) | 34 | 0                         | 100           | 0   | 100           |

\*n: número de amostras

Vários estudos determinaram as taxas de prevalência de STEC no gado, porém a comparação entre os diversos estudos é dificultada devido às diferenças nas técnicas de amostragem e metodologia empregadas. As taxas de prevalência de STEC relatadas variam entre 0% e 100% nos rebanhos (GYLES, 2006). Desta forma, a presença das STEC na carne bovina pode apresentar variações proporcionais a sua prevalência no gado.

Em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro (GUTH *et al.*, 1999), foi avaliada a prevalência de *E. coli* (STEC) em 197 amostras fecais de bovinos sadios, por meio da detecção dos genes de produção da Toxina Shiga (Stx) pela técnica do PCR. Detectou-se a ocorrência do gene *stx1* em cerca de 53% das amostras analisadas. Este dado apontou a alta prevalência de STEC em nosso ambiente e sugerem a necessidade de boas estratégias de controle para a prevenção da contaminação dos produtos de origem animal.

## CONCLUSÃO

As amostras de cortes de carnes bovinas avaliadas neste estudo não apresentaram bactérias *E. coli* do grupo das STEC, evidenciada pela ausência dos genes que codificam a toxina Shiga (*stx1* e *stx2*) e do fator de aderência (gene *eae*) às células epiteliais do intestino. O fato de não ter sido detectada a presença de *E. coli* STEC nas amostras avaliadas não descarta a necessidade de se ampliar a amostragem deste estudo, com o intuito de identificar a presença deste patógeno na nossa cadeia produtiva de carnes.



## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CTC – ITAL, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L.R. **Microbiologia**, 4ª. ed., Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 2004.

GIRARD, F.; BATISSON, I.; FRANKEL, G.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.M. Interaction of enteropathogenic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and tir in adherence. **Infection and Immunity**, v.73, n.9, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of *E. coli* O157 infections linked to topp's brand ground beef patties**. 2007 out. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207.html>>. Acesso em 4 jun. 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with beef from JBS swift beef company**. 2009 jul. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0701.html>>. Acesso em 6 jun. 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Investigation announcement: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to romaine lettuce**. 2011 dez. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/120711/index.html>>. Acesso em 6 jun. 2012.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brasil. **Veterinary Microbiology** v.70, n.1, p.111-121, 1999.

CHAPMAN, P.A.; WRIGHT, D.J.; SIDDONS, C.A. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.424-427, 1994.



DOYLE, M.P. The emergence of new agents foodborne disease in the 1980s. **Food Research International**, v.27, p.219-226, 1994.

DUNCAN , S.E.; CAMERON, R.H. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v.14, n.11, p.656-660, 1994.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Rules and Regulations. 9CFR Parts 416, 417, and 43, 31 de Maio de 2012. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products. **Federal Register**, v.77, n.105, p.31975-31981, 2012.

GACHON, C.; MINGAN A.; CHARRIER, B. Real time PCR: what relevance to plant studies. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1445-1454, 2004.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, E45-E62, 2006.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. **EID Journal**, v.11, n.4, 2005.

ROUNDS, J.M.; RIGDON, C.E.; MUHI, L.J.; FORSTNER, M.; DANZEISEN, G.T.; KOZIOL, B.S.; TAYLOR, C.; SHAW, B.T.; SHORT, G.L.; SMITH, K.E. Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* associated with venison. **EID Journal**, v.18, n.18, 2012.

SHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Journal of Plant Pathology**, v.24, p.250-258, 2002.