



## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS À EPEC E STEC DE CARNES MOÍDAS COMERCIALIZADAS EM LONDRINA-PR

*Nicole Ribeiro de Lima*<sup>1</sup>; *Paulo Alfonso Schuroff*<sup>2</sup>; *Jacinta Sanchez Pelayo*<sup>3</sup>

**RESUMO:** No Brasil, a bovinocultura de corte tem extrema importância, sendo um dos principais destaques do agronegócio no cenário mundial. Dentre os produtos cárneos, a carne moída é amplamente utilizada pela população e constitui excelente meio para a multiplicação de microrganismos pela sua constituição e pela alta manipulação que sofre, podendo ser responsável pela transmissão de doenças para o homem através de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*. Cepas patogênicas de *E. coli* como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) estão frequentemente envolvidas em surtos de infecções transmitidas por alimentos. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo pesquisar fatores de virulência associados aos patótipos de EPEC e STEC em 250 cepas isoladas de amostras de carne moída bovina comercializada em açougues e supermercados de Londrina-PR. Genotipicamente estas cepas foram investigadas para a presença dos marcadores de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfp* e *hlyA* pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Duas cepas (0,8%) foram classificadas como *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) sendo as duas positivas para a sequência *stx2*. Nenhum isolado foi positivo para o gene *eae*, *bfp* e *hlyA*. Com esses resultados espera-se conscientizar tanto a população como os órgãos públicos sobre a importância do controle da qualidade higiênico-sanitária das carnes moídas na prevenção de surtos e infecções transmitidas por alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carne moída; EPEC; STEC .

### 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte representa um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, sendo o Brasil dono do segundo maior rebanho comercial do mundo, alcançando cerca de 200 milhões de cabeças (MAPA, 2013).

Um subproduto dentro os produtos cárneos largamente consumidos é a carne moída, que é obtida a partir da moagem de massa muscular de carcaças de bovinos e deve ser imediatamente resfriada ou congelada.

A carne moída destaca-se entre os produtos cárneos, pela sua aceitabilidade e por se caracterizar como produto popular, sendo acessível a toda população incluindo a de menor poder aquisitivo, além de poder ser usada em refeições de maneiras práticas e variada.

Devido a sua composição e à alta manipulação que sofre, a carne constitui um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros microrganismos, podendo ser

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [nicoleriblima@hotmail.com](mailto:nicoleriblima@hotmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [pauloalfonso@hotmail.com](mailto:pauloalfonso@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientadora, Professora Doutora do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina – Paraná. [jspelayo@gmail.com](mailto:jspelayo@gmail.com)

responsável pela transmissão de doenças para o humano através de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*.

A presença de *E. coli* em alimentos é um dado de alta relevância, já que devido estar presente no intestino de animais de sangue quente, ela se apresenta como um indicador de contaminação fecal do produto. Apesar de algumas cepas contribuírem para o equilíbrio da fisiologia intestinal do hospedeiro, outras apresentam fatores de virulência que as tornam capazes de desencadear infecções severas no organismo hospedeiro (MENG et al., 2007).

Em termos de saúde pública, EPEC e STEC são as mais importantes categorias de *E. coli* diarreiogênicas, principalmente devido ao grande número de surtos causados por estes patotipos em todo o mundo (CALDERON et al., 2010).

As STEC podem causar diversas patologias no ser humano, que envolvem desde diarreias simples, não sanguinolentas, a colites hemorrágicas (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), sendo esta última a principal causa de falência renal aguda em crianças, e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT), que acomete principalmente idoso.

Assim este trabalho objetivou pesquisar fatores de virulência associados aos patotipos de EPEC e STEC em carne bovina moída comercializada na cidade de Londrina-PR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este trabalho 250 cepas de *Escherichia coli* isoladas de 50 amostras de carne bovina moída comercializada na cidade de Londrina-PR no ano de 2013.

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi da fervura, através dos seguintes passos: inoculação das cepas em ágar Luria-Bertani e incubação a 37°C por 18h; transferência de 1,5 mL do crescimento para eppendorf e centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos; resuspensão do pellet em 300 µL de água Milli-Q e fervura por 10 minutos para liberação e desnaturação do DNA bacteriano; e por fim transferência para um isopor com gelo para choque térmico (ALBRIGHT et al. 1989).

A Tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados e temperatura de anelamento. Os genes *eae* e *bfp* foram pesquisados para caracterizar o patotipo de EPEC típica; e *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* para caracterizar o patotipo STEC.

**Tabela 1-** Sequência dos oligonucleotídeos pesquisados, tamanho dos fragmentos de DNA amplificados e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo (5' → 3')	Fragmento (pb)	Anelamento	Referência
<i>bfpA</i>	(F) CAATGGTGCTTGCGCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT	326	60°C	Gunzburg et al., 1995
<i>Eae</i>	(F) TCGTCACAGTTGCAGGCCTGGT (R) CCGAAGTCTTATCAGCCGTAAGT	800	60°C	Paton; Paton 1998
<i>Stx1</i>	(F) ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC (R) AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	55°C	Paton; Paton 1998
<i>Stx2</i>	(F) GGCAGTGTCTGAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	55°C	Paton; Paton 1998
<i>hlyA</i>	(F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	60°C	Paton Paton

A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2 µL do lisado bacteriano, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada iniciador e 1.5 U Taq DNA polimerase.

Depois de amplificado, o produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose de 1,5%, corado com SYBR Safe e visualizado usando luz UV. Bactérias padrões descritas na literatura as quais apresentam os genes pesquisados foram utilizadas como controles positivo e a cepa HB101 (*E. coli* K-12) como controle negativo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 250 cepas isoladas de *Escherichia coli* submetidas à pesquisa dos genes stx1, stx2, eae e hlyA, duas (0,8%) foram positivas para o gene stx2 indicando serem pertencentes ao grupo das STEC. Nenhum isolado foi positivo para os genes stx1, eae e hlyA.

No Brasil, apesar da ocorrência de STEC em alimentos ser extremamente baixa, há relatos de sua presença em carnes e derivados (Bergamini et al., 2007; Rodolpho e Marin, 2007; Alvares, 2011) e de fezes de bovinos (Cerqueira et al., 1999; Rigobelo et al., 2006; von Laer, 2009).

Bergamini et al. (2007) estudaram a ocorrência de STEC em amostras de carne bovina moída comercializadas em duas cidades do Estado de São Paulo. Das 250 amostras analisadas, a bactéria foi detectada em quatro amostras (3,5%). Rigobelo et al. (2008), analisando amostras de carcaças bovinas de abatedores em São Paulo, detectaram STEC em 1,4% das amostras. Rodolpho; Marin (2007) pesquisaram STEC em 91 amostras de carne moída, 154 de moedores de carne e 42 de mãos de funcionários em 23 açougues de Taquaritinga, no noroeste do Estado de São Paulo. STEC foi detectada em 2,1% das amostras de carne moída e 1,2% das amostras de moedores de carne, e estava ausente nas amostras de mãos.

Apesar da prevalência de *E.coli* patogênica ser baixa em carne bovina moída, sabe-se que a maioria das carnes estão contaminadas com *E.coli* não patogênica, o que demonstra que estas carnes estiveram em contato com as fezes e não apresentam qualidade higiênico-sanitária adequada.

### 4 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que apesar da prevalência de STEC na carne bovina moída na cidade de Londrina-PR ser baixa, esse alimento pode ser um risco para a população devido sua alta virulência, principalmente se ingerido cru ou mal cozido, práticas adotadas por grande parte da população.

Com isso, se vê a necessidade de boas práticas de produção e higiene desde o abate do animal até a mesa do consumidor e uma maior fiscalização na qualidade desse alimento pelos órgãos responsáveis.

### REFERÊNCIAS

ALVARES, P.P. Ocorrência e caracterização de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga na linha de abate de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de bovinos e de aves comercializados na região da Grande São Paulo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2011.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.553-556, 2007.

CALDERON, V. E.; CHANG, Q.; McDERMOTT, M.; LYTLE, M. B.; McKEE, G.; RODRIGUEZ, K.; RASKO, D. A.; SPERANDIO, V.; TORRES, A. G. Outbreak Caused by cad-Negative Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O111, Oklahoma. **Foodborne Pathogens & Disease**, vol. 7 (1), p. 107-109, 2010.

CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, n.1/2, p.111-121, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Bovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>

MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; NEUCHAT, L. R. *Food Microbiology : Fundamentals and frontiers*, 3° ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, cap.12, p. 249,269, 2007.

RIGOBELLO, E. C.; STELLA, A. E.; ÁVILA, F. A.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p.194-198, 2006.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.599-602, 2007.

SAITO, N.; KAWANO, M.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, S.; YAMADA, W.; YATSU, J.; KAWAMUKAI, K.; AKIYAMA, K. An outbreak of food poisoning caused by an enteropathogenic *Escherichia coli* O115:H19 in Miyagi Prefecture, Jpn. **J. Infect Dis.** v. 58, pp. 189–190, 2005.

von LAER, A.E. Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaça dos animais abatidos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2009.

