

ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARÇAÇAS BOVINAS

Everlon Cid RIGOBELLO Leonardo Susumu TAKAHASHI Daniel
NICODEMO Fernando Antonio de ÁVILA Renato Pariz MALUTA Urbano dos
Santos RUIZ Ariel Eurides STELLA

Correspondência: UNESP – Campus de Dracena – Faculdade de Zootecnia

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, Km 651 Bairro das Antas CEP 17900-000 Dracena São Paulo Brasil
Fone (18) 3821-8100 - CEP 17.900-000 – Dracena-SP.

Resumo: O objetivo do trabalho foi estabelecer o nível de contaminação por *E. coli* de carcaças bovinas manipuladas em frigoríficos como suas características. Foram coletados esfregaços de carcaças bovinas abatidos em frigorífico comercial no Estado de São Paulo, no período de março de 2006 a julho de 2007. As amostras foram coletadas em três fases do processamento das carcaças; na pré-evisceração, na pós-evisceração e no pós-processamento. Cento e quatorze cepas de *E. coli* foram selecionadas a partir de sessenta carcaças bovinas analisadas. Através da técnica de PCR foi analisada a presença dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, LT-II, STa. O período de coleta compreendeu o período de chuvas e de seca, sendo que a contaminação no período de chuva foi de 59 isolados contra 55 isolados no período da seca. Somente uma das carcaças analisadas permitiu o isolamento de uma cepa apresentando a seqüência codificada do gene *stx2*, sendo portanto classificada como *E. coli* produtora de toxina Shiga Like (STEC). As bactérias confirmadas como *E. coli* através do seu perfil bioquímico foram submetidas ao PCR para detecção de seqüências de genes de virulência. De todas *E. coli* analisadas exceto uma, foi negativa para os gene *stx2* na análise por PCR. e também todas foram negativas para expressão da enterohemolisina. De cada cultura de *E.coli* uma colônia foi testada para avaliação de sua sensibilidade a 11 agentes antimicrobianos. A resistência mais comum foi para cefalotina (72%), ceptriaxone (22%).

Palavras-chave: *Escherichia coli*, STEC, bovinos

ANALYSIS OF THE GENES OF VIRULENCE OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED OF BOVINE CARCASSES

EL ANÁLISIS DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* TENSIONES AISLÓ DE CADÁVERES BOVINOS

Abstract: The objective of the work was to establish the level of contamination for *E. coli* of bovine carcasses manipulated in slaughterhouse as well as your characteristics. Swabs of bovine carcasses were collected abated in slaughterhouse commercial in the State of São Paulo, in the period of March of 2006 to July of 2007. Samples of bovine carcasses were collected in an commercial abattoir in the State of São Paulo, during

March of 2006 to July of 2007. The samples were collected in in three phases of the processing of the carcasses; preevisceration; postvisceration and postprocesing. hundred and fourteen strains E. coli were selected from the sixty bovine carcasses analyzed. Through the technique of PCR was analyzed the presence of the genes stx1, stx2, eae, LT-II, STa. Only one of the analyzed carcasses allowed the isolation of a strain presenting the codified sequence of the stx2 gene, being therefore classified as E. coli Shiga-Like producing (STEC). The bacterias confirmed as E. coli through your biochemical profile were submitted to PCR for detection of sequences of virulence genes. Of all E. coli analyzed except one, it went negative to the gene stx2 in the analysis for PCR. and also all went negatives to expression of the enterohemolisina. Of each culture of E.coli a colony was tested for evaluation of your sensibility to 11 antimicrobians agents. The resistance more commonly observed it went to cefalotin (72%), ceptriaxone (22%),

Keywords: *Escherichia coli*, STEC, cattle

Introdução

O gado bovino é um reservatório natural de cepas de *Escherichia coli*, e muitos sorogrupos encontrados em suas fezes correspondem aos mesmos responsáveis por casos de diarréia em humanos, principalmente em crianças. Nas últimas duas décadas, os sorogrupos O26 e O111, por exemplo, foram reconhecidamente os mais importantes envolvidos em diarréia infantil no Brasil (ROSA et al., 1998).

Esses sorogrupos podem também portar os genes que codificam a toxina Shiga-like, responsável por causar doenças muito severas em seres humanos, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU). O bovino pode estar contaminado com E. coli produtora de Shiga-like (STEC), sem apresentar sintoma algum de doença (BLANCO et al., 1997)

Durante o processo de abate do gado bovino, pode ocorrer a transferência da bactéria (STEC), contida na pele do animal ou nas fezes para a carcaça do animal abatido. Se os procedimentos de higienização do matadouro não forem capazes de eliminar essas bactérias e as carcaças serão contaminadas tornando-se um problema de saúde pública, com a grande possibilidade de causar infecção nos consumidores dessa carne (BELL, 1997; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001).

No Brasil os sorogrupos existentes podem carregar os genes que sintetizam a toxina Shiga-like, tornando-se importante a verificação da presença desses genes nas amostras bacterianas isoladas de carcaças de bovinos no Brasil.

Materiais e Métodos

As amostras foram coletadas de 20 carcaças por fase em três fases distintas de abate no frigorífico. A mesma carcaça foi amostrada em cada fase totalizando 60 carcaças. A amostra da pré-evisceração foi coletada imediatamente após a retirada da pele; a amostra da pós-evisceração foi coletada após a evisceração; a amostra do pós-processamento foi coletada depois da lavagem da carcaça, com ela ainda fresca.

Um total de 114 cepas de *E. coli* foi submetido ao PCR; stx1, stx2 e eae foram os genes testados usando os primers e as condições de PCR descritas por CHINA et al., (1996).

Os testes de resistência das bactérias aos diversos antimicrobianos foram feitos através do método de disco de difusão conforme o manual do National Committee for Clinical Laboratory Standards (National, 2000).

Resultados e Discussão

A distribuição dos isolados de *E. coli* em relação a cada fase e a cada período de coleta é apresentada na Tabela 1. A distribuição de *E. coli* nos três estágios de cada amostragem apresenta as características semelhantes para a estação das águas e para a estação da seca; contudo o número de isolados na estação das águas é maior que da estação da seca. O número de isolados de *E. coli* nas três diferentes fases do processamento foram: Pré-evisceração 21,0%; no período das chuvas e 22,8% no período da seca; pós-evisceração 23,6% contra 22,8% e pós-processamento 7,%; nos períodos das chuvas e seca. Em todas as coletas a fase de maior contaminação foi a da pós-evisceração (Tabela1).

Foi possível verificar uma grande diminuição na contaminação das carcaças durante o processamento.

Tabela 1. Distribuição estacional (seca e água) das 114 cepas de *Escherichia coli* isoladas de 60 carcaças em um frigorífico no Brasil durante o período de março de 2006 a julho de 2007.

Coletas	Período	Carcaças			Total
		Pre-evisceração	Pós-evisceração	Pós-processamento	
Março/2006	Chuva	12/20 *	13/20	6/20	31
Junho/2006	Seca	13/20	16/20	2/20	31

Março/2007	Chuva	12/20	14/20	2/20	28
Julho/2007	Seca	8/20	10/20	6/20	24
					114

* Os valores são números de amostras positivas para *E. coli* / total de amostras coletadas

As bactérias confirmadas como *E. coli* através do seu perfil bioquímico foram submetidas ao PCR para detecção de seqüências de genes de virulência. De todas *E. coli* analisadas exceto uma, foi negativa para os gene *stx2* na análise por PCR. e também todas foram negativas para expressão da enterohemolisina. De cada cultura de *E.coli* uma colônia foi testada para avaliação de sua sensibilidade a 11 agentes antimicrobianos. A resistência mais comumente observada foi para cefalotina (72%), ceptriaxone (22%), ciprofloxacina (22%) e de forma menos freqüente para amicacina (4%), estreptomicina (7,0%) e gentamicina (9,0%).

Os dados do presente trabalho permitem verificar que depois do estágio de pós-processamento houve um grande decréscimo na contaminação o que pode ser observado na Tabela 1. O maior número de amostras coletadas foi durante os meses do verão (estação das chuvas), e a única amostra STEC isolada portando o gene para a toxina *stx2* foi também durante o período das águas e em todas as fases de coletas a contaminação durante o período das águas foi maior do que o período da seca o qual tem sido associado com um pico na freqüência de contaminação por *E. coli* e colonização por STEC em bovinos (VAN DONKERSGOED et al., 1999).

Na Tabela 1 pode-se observar que em todas as coletas na fase de pré-evisceração a carcaça possuía uma contaminação inicial e também que essa contaminação aumentou depois da fase da evisceração, indicando que houve uma contaminação da carcaça pelas bactérias da microbiota do animal. Entretanto também houve em todas as coletas uma diminuição da contaminação das carcaças analisadas após a fase de pós-processamento indicando que apesar de ocorrer em todas as coletas, a transferência das bactérias da microbiota do animal para a carcaça durante a fase de evisceração a contaminação final foi pequena, indicando que o nível de higienização do frigorífico se mostrou eficiente, diminuindo essa contaminação. GILL & BRYANT, (1997) analisaram amostras de fezes de animais, da pele e das carcaças durante todo o processamento e verificaram uma diminuição do número de isolados principalmente

nos últimos estágios quando a carcaça estava sob refrigeração, o que coincide com os resultados deste trabalho.

Em maio/junho de 1992 casos de infecção com *E. coli* O157:H7 produtora de Vero toxina (VT+) foram associados ao consumo de carne de um abatedouro em Yorkshire. Durante a investigação no abatedouro foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto de bovinos utilizando “swab”, amostras de carne e “swab” da superfície da carcaça. Amostras de *E. coli* O157:H7 foram isoladas de 84 amostras das 2103 amostras de fezes coletadas do reto, de 7 das 23 amostras de carcaças analisadas. Esse estudo demonstrou que o gado bovino pode ser um reservatório para a *E. coli* O157:H7 e que a contaminação da carcaça durante o abate e processamento da carne pode ser a explicação do porquê os bifês (hambúrguer) se tornaram contaminados, podendo transmitir esse organismo para o homem (CHAPMAN et al., 1993).

Não apenas do bovino contaminado, mas também do bovino aparentemente saudável foi possível o isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes (GRIFFIN & TAUXE, 1991) de rebanhos dos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Alemanha. A porcentagem de isolamento foi em torno de 1% em gado saudável e em maior proporção em gado com diarreia. Não somente a *E. coli* O157, mas também outras *E. coli* produtoras de toxina Shiga-like foram isoladas, incluindo sorogrupos reconhecidamente patogênicos para a espécie humana como O26 e O111.

Conclusões

Este estudo sugere que o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos por cepas STEC não O157 deve ser um motivo de preocupação no Brasil e faz-se necessário entender como as cepas de STEC desenvolveram resistência a múltiplos antibióticos, para isso são necessários mais estudos para definir os mecanismos de resistência e assim minimizar o seu desenvolvimento.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo auxílio pesquisa.

Literatura citada

BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, G.A.; SIRAGUSA, G.R et al. Genotype analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 non motile isolates recovered from beef

cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, n.67, p.3810-3818, 2001.

BELL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination of beef carcasses.

Journal of Applied Microbiology, v.82, p.292-300, 1997.

BLANCO, M; BLANCO, J.E; BLANCO, J; MORA, A; PRADO, C; ALONSO, M.P; MOURINO, M; MADRID, C; BALSALOBRE, C; JUAREZ, A., Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p.309-319. 1997.

CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A.; WRIGHT, D.J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection in man. *Epidemiology and Infection*, v.111, p. 439-447, 1993.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, p. 3462-3463, 1996.

GILL, C.O; BRYANT, J. Assessment of the hygienic performances of two beef carcass cooling processes from product temperature history data or enumeration of bacteria on carcass surfaces. *Food Microbiology*, v.14, p.593-602, 1997.

GRIFFIN, P.M.; OSTROFF, S.M., TAUXE, R.V; GREENE, K.D; WELLS, J.G.; LEWIS, J.H; BLAKE, P.A. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Review.**, v.13, p.60-98, 1991.

NATARO, J.P & KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, v.11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance Standards for antimicrobial disk dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals approved Standard M31A, 19, 11. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, P.A, 2000.

ROSA, A.C.P. MARIANO, A.T.; PEREIRA, A.M.S.; TIBANA, A.; GOMES.T.A.T.; ANDRADE, J.R.C. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* Isolates from infants

with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, p.781-790, 1998.

VAN DONKERSGOED, J.; GRAHAM T; GANNON, V., The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella in the faeces and rumen of cattle at processing. **Canadian Veterinary Journal**, v. 40, p. 332-338, 1999.