

Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas

[Molecular and phenotypic characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) non-O157 strains from bovine feces and carcass]

A.F. Carvalho, S. Miyashiro, A.F.C. Nassar, A. Noda, D.T. Gabriel, L. Baldassi

Instituto Biológico - Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal - São Paulo, SP

RESUMO

Foram coletados 100 suabes retais e 100 suabes de carcaças bovinas em matadouros do estado de São Paulo, e um total de 326 estirpes de *E. coli* foram identificadas, sendo 163 de amostras retais e 163 de amostras de carcaça. Todos os isolados submetidos à PCR para detecção dos genes das toxinas Stx1 e Stx2 foram identificados como não-O157 e fenotipados pelo teste da citotoxicidade em células Vero. Das 26 estirpes que apresentaram apenas o gene *stx1*, das 56 que apresentaram apenas o gene *stx2* e das 30 estirpes que apresentaram ambos os genes, 17 (65,4%), 42 (75%) e 22 (73,3%), respectivamente, foram positivas ao teste de citotoxicidade. Não houve diferença estatística entre os três perfis genéticos e na positividade ao teste de citotoxicidade. Os resultados mostram a alta frequência de expressão dos fatores de virulência das STEC de bovinos.

Palavras-chave: bovino, *Escherichia coli*, STEC, fezes, carcaça

ABSTRACT

In the present study 100 rectal and 100 carcass swabs were collected from bovines at slaughterhouses in São Paulo state, and the total of 326 *E. coli* strains were identified (163 from rectal samples and 163 from carcass samples). All the isolates were submitted to PCR for Stx1 and Stx2 toxin gene detection and all strains were identified as non-O157 and phenotyped by the cytotoxicity test in Vero cells. Out of 26 strains that presented only the *stx1* gene, 56 that presented only the *stx2* gene and 30 that presented both genes, 17 (65.4%), 42 (75%) and 22 (73.3%), respectively, were positive for the cytotoxicity test. There was no statistically significant difference among these three toxinotyping profiles and positivity in the cytotoxicity test, but the results show high frequency of virulence factor expression of bovine.

Keywords: bovine, *Escherichia coli*, STEC, feces, carcass

INTRODUÇÃO

Os principais fatores de virulência da *Escherichia coli* produtora de shiga-toxina (STEC) são proteínas citotóxicas ativas em células Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). STEC são os principais patógenos de origem alimentar associados à gastroenterite em humanos, causando desde diarreia a complicações, como colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (Karmali, 1989; Ojo *et al.*, 2010). Ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, são portadores assintomáticos,

destacando-se como os principais reservatórios de STEC que causam infecções em humanos (Blanco *et al.*, 2003; Ojo *et al.*, 2010).

A transmissão de STEC ocorre mediante o consumo de carnes cruas ou malcozidas, produtos laticínios não pasteurizados, vegetais e água contaminados. Ruminantes selvagens também são considerados potencial fonte de infecção para o homem (Blanco *et al.*, 2003). Segundo Moreira *et al.* (2003), regiões com alta prevalência de STEC em bovinos, normalmente, têm altas taxas de infecções humanas associadas à *Escherichia coli* produtora de shiga-toxina.

Recebido em 1 de março de 2012

Aceito em 1 de agosto de 2012

E-mail: linebio@gmail.com

As STEC produzem dois tipos de toxina, Stx1 e Stx2, codificadas por fagos temperados que estão íntegros no cromossomo da *E. coli* (Strockbine et al., 1986). Essas estirpes também podem expressar a proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, que constitui outro fator de virulência responsável pela aderência e destruição do epitélio intestinal. Estirpes de STEC que carregam os genes *stx1*, *stx2* e *eae* estão associadas com as doenças humanas mais severas (Shaw et al., 2004), sendo que o gene *stx2* compreende 11 variantes distintas e é considerado o fator de virulência mais importante das STEC associado a doenças humanas (Brett et al., 2002).

Métodos tradicionais para identificação de STEC em amostras de fezes envolvem cultivos de enriquecimento, seleção das colônias bacterianas, análise bioquímica dos isolados e determinação dos principais marcadores de virulência, tais como as shiga-toxinas. Essa metodologia é laboriosa, demorada e requer vários dias para a identificação dos microrganismos (Osek, 2002). A reação de PCR tem sido considerada a metodologia mais sensível para determinação da presença das STEC em amostras fecais ou de alimentos (Paton e Paton, 1998), mesmo para detecção de *E. coli* O157 e outros sorogrupos (Osek, 2002).

A maioria dos estudos, até o momento, tem se concentrado na pesquisa de STEC sorovar O157:H7, porém têm sido frequentemente observadas infecções humanas por STEC sorogrupo não-O157 (Menrath et al., 2010). Deste modo, o presente estudo teve o objetivo de estudar a ocorrência de *Escherichia coli* não-O157 produtora de shiga-toxina (STEC) em intestinos e carcaças de bovinos saudáveis levados ao abate em matadouro do estado de São Paulo, bem como comparar suas características fenotípica e molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de um ano, foram colhidos pareadamente 100 suabes retais e 100 suabes das carcaças bovinas em matadouro do estado de São Paulo. Os suabes foram imediatamente colocados em tubos contendo caldo de infusão cérebro-coração (BHI; Difco) e levados ao laboratório para análise dentro de até 24 horas em caixa de isopor contendo gelo reciclável. As suspensões

foram semeadas em placas de ágar Levine EMB (Difco) e incubadas a 37°C por 18-24 horas em aerobiose. De acordo com a quantidade de UFCs com características de *E. coli* isoladas na amostra, foram selecionadas aleatoriamente até três colônias suspeitas (enegrecidas com brilho verde-metálico) por amostra e confirmadas por testes bioquímicos: triple sugar iron (TSI), citrato e produção de indol (Koneman, 2008).

Para observação da presença e do tipo de hemólise apresentada, todas as estirpes de *E. coli* foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (Difco) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose.

Para detecção dos genes produtores da shiga-toxina, as estirpes de *E. coli* foram submetidas à reação de Multiplex-PCR com *primers* descritos por Paton e Paton (1998), identificando os genes *stx1* e *stx2* que amplificam fragmentos de 180 e 255 pares de bases (pb), respectivamente. A amplificação de DNA foi realizada num volume total de 50µL contendo 10mM de Tris HCl pH 9,0, 3mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo, 20pmol de cada *primer* (*stx1F*, *stx1R*, *stx2F* e *stx2R*), três unidades de Taq DNA polimerase e 10µL de DNA. Anteriormente ao ciclo de temperaturas para amplificação do DNA, foi utilizada desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e, ao final, extensão a 72°C por 10 minutos. A amplificação compreendeu 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização a 59°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Para detecção das estirpes não-O157, foi realizada a PCR utilizando-se os *primers* O157F e O157R descritos por Paton e Paton (1998), os quais amplificam fragmentos de 259 pb referentes à porção da região de *rfb* que codifica antígeno O de *E. coli* O157. Para a amplificação, foram utilizados 10mM de Tris HCl pH 9,0, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de cada nucleotídeo (dNTPs), 200µM de cada dNTP, 30pmol de cada *primer* (O157F e O157R), 1,5 unidade de Taq DNA polimerase e 10µL de DNA. Anteriormente ao ciclo de temperaturas para amplificação do DNA, foi utilizada desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e, ao final, extensão a 72°C por 10 minutos. A amplificação compreendeu 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização a 59°C por 60

Caracterização molecular...

segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Como controle positivo das reações, foram utilizadas estirpes STEC (*stx1* e *stx2* positivas) não-O157, isoladas no laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo.

As amplificações foram realizadas em termociclador Peltier Thermal Cycler-100 (MJ Research), e a análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,3%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e, posteriormente, fotografado sob luz ultravioleta (300-320nm) pelo sistema de fotodocumentação Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom, com o *software* 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

Para detecção da produção de toxinas em células Vero, os isolados de *E. coli* foram incubados *overnight* a 37°C em caldo tripticase de soja (Difco) com homogeneização a 250rpm e centrifugados a 18000g por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados com filtros estéreis 0,45µm (Sartorius) e, então, utilizados para preparar diluições seriadas na base 2 (1:4 a 1:16) em meio mínimo essencial (MEM), e 50µL de

cada diluição foram inoculados em 100µL de monocamadas confluentes de células Vero cultivadas em microplacas de 96 orifícios. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, e as mudanças morfológicas nas células foram observadas após 24 e 48 horas de incubação, por microscópio invertido com contraste de fase. Foram consideradas positivas as estirpes que produziram efeito citotóxico a partir da diluição 1:8.

RESULTADOS

A partir de 78/100 (78%) dos suabes retais e 77/100 (77%) dos suabes de carcaças, foram isoladas 326 estirpes de *E. coli*, sendo 163 (50%) de origem retal e 163 (50%) de carcaça.

Das *E. coli* identificadas, foi possível detectar a presença dos genes das toxinas por meio da PCR, num total de 112/326 (34,4%) estirpes provenientes de 42/78 (53,8%) suabes retais e de 27/77 (35,1%) suabes de carcaça. Dessas, 26/112 (23,2%) estirpes continham o gene *stx1*; 56/112 (50%) continham o gene *stx2*; e 30/112 (26,8%) continham ambos os genes (Fig. 1).



Figura 1. Resultados obtidos na amplificação por Multiplex-PCR para detecção dos genes *stx1* e *stx2* nas estirpes de *E. coli*. 1: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Invitrogen); 2-18: estirpes de *E. coli* isoladas; 19: controle positivo; 20: controle negativo.

Todas as estirpes (112/112 – 100%) que continham pelo menos um dos genes da shiga-toxina foram identificadas como STEC não-O157 por meio da PCR; portanto, todas as STEC foram avaliadas quanto ao teste de citotoxicidade em células Vero.

Foram positivas ao teste de citotoxicidade 17/26 (65,4%) estirpes que apresentavam apenas o gene *stx1*; 42/56 (75%) que apresentavam apenas o gene *stx2*; e 22/30 (73,3%) que apresentavam ambos os genes, totalizando 81/112 (72,3%) estirpes em que foi observado efeito citopático nas diluições maiores ou iguais a 1:8 (Tab. 1).

Tabela 1. Resultados do teste de citotoxicidade em células Vero das estirpes STEC não-O157

| PCR | <i>stx1</i> +/ <i>stx2</i> - | <i>stx1</i> -/ <i>stx2</i> + | <i>stx1</i> +/ <i>stx2</i> + | Total |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|
| Citotoxicidade | | | | |
| + | 17 | 42 | 22 | 81 |
| - | 9 | 14 | 8 | 31 |
| Total | 26 | 56 | 30 | 112 |

Das estirpes de *E. coli* identificadas, 233/326 (71,5%) não apresentaram hemólise; 87/326 (26,7%) apresentaram β -hemólise; 4/326 (1,2%) apresentaram α -hemólise; e 2/326 (0,6%) apresentaram dupla hemólise no cultivo em ágar Mueller-Hinton acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Das estirpes que

continham pelo menos um dos genes da shiga-toxina, observou-se que 82/112 (73,2%) não apresentavam hemólise; 29/112 (25,9%) apresentavam β -hemólise; nenhuma (0%) apresentou α -hemólise; e 1/112 (0,9%) apresentou dupla hemólise (Tab. 2).

Tabela 2. Presença de hemólise em ágar sangue Mueller-Hinton das estirpes de *E. coli* com relação à detecção dos genes *stx1* e *stx2*

| Hemólise | <i>stx1</i> - / <i>stx2</i> - | <i>stx1</i> + e/ou <i>stx2</i> + | Total |
|----------|-------------------------------|----------------------------------|-------|
| Ausência | 151 | 82 | 233 |
| β | 58 | 29 | 87 |
| α | 4 | 0 | 4 |
| Dupla | 1 | 1 | 2 |
| Total | 214 | 112 | 326 |

DISCUSSÃO

As STEC são uma importante causa de doenças gastrointestinais, particularmente no homem, já que tais infecções podem resultar em sequelas, como síndrome hemolítico-urêmica (SUH) e púrpura trombótica trombocitopênica. A morbidade e a mortalidade associadas com surtos recentes de doença por STEC têm alertado sobre o risco deste microrganismo para a saúde pública. Por esta razão, há uma demanda crescente por procedimentos diagnósticos melhores para detecção de STEC em materiais fecais e, em particular, em alimentos como carnes e produtos lácteos (Paton e Paton, 1998). A lista completa de determinantes de virulência necessários para que as STEC causem a SUH não é conhecida, entretanto as shiga-toxinas são um fator-chave na patogênese da doença. A presença do gene *eae* não está inteiramente ligada à patogenicidade no homem, e estirpes não-O157 sem esse gene têm sido associadas a surtos e casos esporádicos da doença em humanos (Paton et al., 1999; Feng et al., 2001).

No presente estudo, foram isoladas 163 estirpes de *E. coli* a partir de 78/100 (78%) suabes retais e 163 estirpes de *E. coli* a partir de 77/100 (77%) suabes de carcaça, sendo que todas foram identificadas como não-O157. Nas 326 estirpes de *E. coli* isoladas, foi pesquisada a presença dos genes *stx1* e *stx2* por PCR, observando-se ausência de ambos na maioria: 214/326 (65,6%), tanto em estirpes provenientes do reto quanto da carcaça. A presença de pelo menos um dos dois genes *stx* pesquisados teve distribuição estatisticamente significativa de acordo com a origem da amostra ($\chi^2=9,195$; $P=0,002$), tendo sido detectado *stx1* e/ou *stx2* em 69/163 (42,3%) estirpes isoladas a partir dos suabes retais e 43/163 (26,4%) das estirpes isoladas dos suabes de carcaças.

Na avaliação da citotoxicidade em cultura de células Vero, foram positivas 17/26 (65,4%) das estirpes que continham apenas o gene *stx1*; 42/56 (75%) das estirpes que continham apenas o gene *stx2*; e 22/30 (73,3%) das estirpes que continham ambos os genes, não havendo diferença significativa entre estes três perfis obtidos na

PCR e a positividade no teste de citotoxicidade ($\chi^2=0,952$; $P=0,621$).

Independentemente da presença de um dos genes *stx* ou de ambos, a maioria das estirpes expressou as toxinas, portanto, a detecção desses genes pela técnica da PCR pode ser um importante indicativo do potencial patogênico de *E. coli*. No presente estudo, não houve uma relação entre a presença dos genes *stx* e a produção de hemólise no meio de ágar Mueller-Hinton acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro ($\chi^2=0,242$; $P=0,489$), diferentemente do verificado por Moon (1974), que afirmou que geralmente *E. coli* patogênicas são hemolíticas (90%). No entanto, o mesmo autor encontrou 29% de estirpes que não continham nenhum dos genes pesquisados e que apresentaram hemólise no ágar sangue, dados semelhantes ao do presente estudo, onde 29,4% (63/214) das estirpes que não apresentavam os genes *stx*, eram hemolíticas.

As STEC são descritas como agentes causadores de diarreia e disenteria em bovinos, porém altas frequências de STEC também são observadas em bovinos não diarreicos (Leomil *et al.*, 2003). Neste estudo, observou-se o isolamento de STEC em amostras de animais saudáveis, sendo que a presença apenas do gene *stx2*, que é considerado o fator de virulência mais importante associado a doenças humanas, foi predominante nas estirpes provenientes das amostras fecais de bovinos (50%).

No Brasil, Irino *et al.* (2005) pesquisaram a ocorrência de STEC em 153 amostras fecais de bovinos saudáveis provenientes de fazendas leiteiras do estado de São Paulo, sendo detectadas 220 estirpes STEC por PCR, das quais apenas 3% continham o gene *stx1*, 40,6% o gene *stx2* e 56,4% continham ambos os genes. Leomil *et al.* (2003) pesquisaram a ocorrência de STEC em 344 amostras fecais, sendo 205 provenientes de bovinos saudáveis e 139 de bovinos com diarreia, coletadas em fazendas de gado do estado de São Paulo, onde foram detectadas 44 estirpes STEC por PCR, sendo que 12 (50%) foram positivas para o gene *stx1*, quatro (16,7%)

para o gene *stx2* e oito (33,3%) para ambos os genes. Além destes, foram realizados outros estudos em diferentes partes do mundo envolvendo as STEC (Zweifel *et al.*, 2005; Lefebvre *et al.*, 2009; Ojo *et al.*, 2010), os quais mostraram a existência de variações no perfil da presença dos genes *stx1* e *stx2* dependendo do tipo e da origem das amostras analisadas. No presente estudo, dentre as STEC isoladas a partir de amostras bovinas, foi observada maior frequência de estirpes com apenas o gene *stx2* (56/112), porém 72,3% (81/112) das STEC expressaram as verotoxinas independentemente da presença de um ou de ambos os genes.

Bovinos e ovinos são os reservatórios primários de STEC, mas essas têm sido isoladas também em cavalos, cães e pássaros. As STEC são transmitidas ao homem mediante o consumo de alimentos contaminados, como carnes cruas ou malcozidas e leite não pasteurizado. O homem também pode se infectar com STEC pela ingestão de vegetais, frutas e água contaminados, ou pelo contato direto com fezes infectadas.

A sorotipagem das STEC é insuficiente para determinar as propriedades patogênicas das estirpes, pois tais microrganismos são muito variáveis no repertório dos determinantes de virulência. Portanto, análises dos genótipos de estirpes de STEC pelo uso de sondas genéticas específicas ou PCR, promovem informações mais detalhadas sobre a variabilidade genética e os subtipos.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados reforçam o fato de que os bovinos são reservatórios de STEC e podem transmitir esse patógeno ao homem, tanto por contato direto com animais portadores como pela manipulação e ingestão de produtos cárneos contaminados, visto que foi comprovada a presença de STEC com plena atividade da shiga-toxina em amostras de carcaças bovinas, sendo necessária a adoção de medidas efetivas para a prevenção da contaminação de produtos animais destinados ao consumo humano.

REFERÊNCIAS

- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E. *et al.* Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Bio. Med.*, v.228, p.345-351, 2003.
- BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEIM, K.A. *et al.* Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *Stx2*-EDL933 and/or *Stx2v*hb subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.2716-2722, 2002.
- FENG, P.; WEAGANT, S.D.; MONDAY, S.R. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.24-28, 2001.
- IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I. *et al.* Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Vet. Microbiol.*, n.105, p.29-36, 2005.
- KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.2, p.15-38, 1989.
- KONEMAN, E.W.; WILLIAM, M.J.; SCHRECKENBERGER, P.C. *et al.* Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.18, p.775-779, 1977.
- LEFEBVRE, B.; DIARRA, M.S.; VINCENT, C. *et al.* Relative cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef cattle and humans. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.6, p.357-364, 2009.
- LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.C. *et al.* Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.97, p.103-109, 2003.
- MENRATH, A.; WIELER, L.H.; HEIDEMANN, K. *et al.* Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Gut Pathogens*, v.2, p.1-9, 2010.
- MOON, H.W. Pathogenesis of enteric diseases caused by *Escherichia coli*. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.18, p.179-208, 1974.
- MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.93, p.179-183, 2003.
- OJO, O.E.; AJUWAPE, A.T.; OTESILE, E.B. *et al.* Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. *Int. J. Food Microbiol.*, v.142, p.214-221, 2010.
- OSEK, J. Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. *Let. Appl. Microbiol.*, v.34, p.304-310, 2002.
- PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, *rfbO111* and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, p.598-602, 1998.
- PATON, A.W.; WOODROW, M.C.; DOYLE, R.M. *et al.* Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3357-3361, 1999.
- SHAW, D.J.; JENKINS, C.; PEARCE, M.C. *et al.* Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.7456-7465, 2004.
- STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.M.; NEWLAND, J.W. *et al.* Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.*, v.53, p.135-140, 1986.
- ZWEIFEL, C.; SCHUMACHER, S.; BLANCO, M. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Vet. Microbiol.*, v.105, p.37-45, 2005.