Escherichia coli Shiga-toxigênica (STEC) em carne bovina no Estado de Mato Grosso: ocorrência, perfis genéticos e impacto na Saúde Única

Autor(res)

Eduardo Eustáquio De Souza Figueiredo
Andressa Ricci Biz Messias
Ricardo César Tavares Carvalho
Adelino Da Cunha Neto

Categoria do Trabalho

Pós-Graduação

Instituição

UNIC BEIRA RIO

Introdução

A toxina Shiga (stx) é o fator de virulência definidor da Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC). Essa toxina possui dois tipos principais, sendo elas stx1 e stx2 que são divididas em vários subtipos (Bergan et al., 2012). Elas podem causar danos a células intestinais, levando desde a diarreia sanguinolenta até a síndrome hemolítico-urêmica e morte.

STEC é um dos patógenos mais importantes em doenças transmitidas por alimentos atualmente, e possui mais de 400 cepas, sendo os sorogrupos O157 e as big six não O157 (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) (Conrad et al., 2014). A presença STEC em carne bovina representa um risco a saúde única podendo apresentar resistência a antibióticos, adesão a superfícies (formação de biofilme) e tolerância a estresses ambientais (Figueiredo et al., 2019).

O principal hospedeiro e disseminador de STEC são os bovinos, os quais podem atuar também como reservatório primário e assintomático do patógeno (Smith; Fratamico; Gunther, 2004). Dentro desse contexto, destacam-se os bovinos classificados como Super-shedding. Eles excretam altas concentrações da bactéria, elevando o risco de contaminação ambiental e, consequentemente, a transmissão ao longo da cadeia produtiva de carne (Chase-Topping et al., 2007).

Várias metodologias têm sido propostas para detecção e isolamento de STEC em amostras de alimentos e ambientais. Desde as técnicas tradicionais de isolamento microbiológico (Verstraete et al., 2010) até abordagens moleculares, como PCR ou qPCR (Castro et al., 2021) apresentam limitações ou inconsistências.

O monitoramento de riscos biológicos na produção de alimentos é imprescindível para a segurança alimentar. Apesar da importância do estado de Mato Grosso na pecuária de corte, estudos sobre a presença de STEC em bovinos e carne ainda são escassos, evidenciando a necessidade de maior investigação local.

Objetivo

- Isolar e cultivar cepas de STEC a partir de carne bovina;
- Padronizar método molecular para detecção e identificação de STEC O157 e das big six;
- Realizar o sequenciamento completo do genoma de STEC cultivadas, identificando os genes responsáveis

pela capacidade de formação de biofilme, resistência antimicrobiana e ilhas genômicas relacionadas à resistência térmica e sanitizante.

Material e Métodos

Será realizada a coleta de 200g carne em pedaço e moída em estabelecimentos comerciais, no Estado de Mato Grosso. As amostras serão transportadas ao Laboratório de Microbiologia para processamento.
As amostras serão processadas conforme protocolo de isolamento descrito por Castro et al. (2019). Resumidamente 10g das amostras de carne serão acondicionadas em um homogeneizador de amostras (Stomach), adicionado 90mL de Caldo TSB modificado (sem novobiocina) e incubadas a 41,5°C por 24h. Em seguida, as culturas serão semeadas em ágar MacConkey suplementado com cefixima e telurito e incubadas a 37°C por 24h. Cinco colônias incolores suspeitas de STEC serão purificadas em ágar tripticase com extrato de levedura (incubadas novamente a 37°C por 24h) e repicadas em ágar eosina azul de metileno (novamente seguindo a incubação a 37°C por 24h). As colônias de coloração preta, com ou sem brilho verde metálico, serão transferidas para tubos de ágar nutriente e submetidas aos testes bioquímicos clássicos (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato) para confirmação de E. coli.
O DNA genômico será extraído de acordo com Castro et al. (2021), a partir da semeadura das cepas em caldo LB usando o kit Blood & Tissue DNeasy®, seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação será feita no fluorímetro Qubit 2.0. Será realizado um screening através da qPCR utilizando o kit RapidFinder™ STEC Screening Assay de acordo com as recomendações do fabricante.
As amostras positivas para STEC então, passarão por PCR convencional para agrupamento e classificação de acordo com os sorotipos encontrados. A metodologia e os primers utilizados seguirão os parâmetros descritos por Scheutz et al. (2012)
Futuramente, as amostras de interesse passarão por sequenciamento genômico para confirmação das cepas. As sequencias obtidas serão comparadas com as disponíveis na plataforma NCBI.

Resultados e Discussão

Contribuições esperadas
Espera-se que este estudo contribua para a padronização e consolidação de uma metodologia melecular para detecção e identificação de Escherichia coli Shiga-toxigênica (STEC) O157 e dos principais sorogrupos não-O157 (big six). A uniformização dos procedimentos laboratoriais permitirá maior confiabilidade no monitoramento desses patógenos em carne bovina.
Os resultados fornecerão dados sobre a ocorrência e diversidade genética de STEC em carne bovina no Mato Grosso, região estratégica para a pecuária nacional. A caracterização das cepas isoladas permitirá determinar quais os sorotipos circulantes em Mato Grosso e qual é o predominante.
O sequenciamento genômico completo das cepas de interesse permitirá realizar análises comparativas com isolados nacionais e internacionais, favorecendo o rastreamento de linhagens e a compreensão da variabilidade genética desses microrganismos.
Com base nesses achados, será possível subsidiar estratégias de controle sanitário, fortalecer a vigilância epidemiológica e orientar políticas públicas voltadas à segurança alimentar. A pesquisa também ampliará o conhecimento no contexto da Saúde Única, ao integrar aspectos da saúde animal, humana e ambiental.

Conclusão

Considerações finais

O projeto visa entregar a padronização de um protocolo reprodutível para isolamento e identificação de Escherichia coli STEC (O157 e big six), um conjunto de dados genômicos de referência para STEC em carne bovina no Mato Grosso e análises direcionadas de fatores de virulência, biofilme e resistência (térmica/sanitizante/antimicrobiana), o que deverá reduzir a variabilidade analítica entre laboratórios, facilitar a incorporação do método em rotinas de vigilância e controle e fortalecer a resposta sanitária regional.

Agência de Fomento

CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Referências

BERGAN, J. et al. Shiga toxins. Toxicon, v.60, n.6, p.1085-1107, 2012. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016.

CASTRO, V.S. et al. Inconsistent PCR detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli: Insights from whole genome sequence analyses. PLoS ONE, v.16, n.9, e0257168, 2021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257168.

CASTRO, V.S. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of E. coli non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. Trop. Anim. Health Prod., v.51, p.1117-23, 2019. https://doi.org/10.1007/s11250-018-01792-z

CHASE-TOPPING, M.E. et al. Risk factors for the presence of high-level shedders of Escherichia coli O157 on Scottish farms. J. Clin. Microbiol., v.45, n.5, p.1594-1603, 2007. https://doi.org/10.1128/JCM.01690-06.

FIGUEIREDO, E.E. et al. Comparison of heating block and water bath methods to determine heat resistance in Shiga-toxin producing Escherichia coli with and without the locus of heat resistance. J. Microbiol. Meth., v.164, e105679, 2019. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105679.

SCHEUTZ, F. et al. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. J Clin Microbiol., v.50, n.9, p.2951-63. 2012. https://doi.org/10.1128/jcm.00860-12:

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Shiga toxin-producing Escherichia coli. Adv. Appl. Microbiol., v.86, p.145-197, 2014. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2.

VERSTRAETE, K. Effect of the enrichment time and immunomagnetic separation on the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive O157 from artificially inoculated cattle faeces. Vet. Microbiol., v.145, n.1-2, p.106-112. 2010. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.004.