



## CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM FILÉ DE PEITO DE FRANGO INSPECIONADO COMERCIALIZADO NO NORTE DO TOCANTINS

**NASCIMENTO**, Amanda Lima do; **Ribeiro Júnior**, José Carlos

### RESUMO

A carne de frango é amplamente consumida no Brasil, e a avicultura comercial é uma das principais atividades econômicas, incluindo a região norte do Tocantins, onde um grande estabelecimento abate cerca de 90 mil aves por dia. Durante a manipulação de produtos de origem animal, a contaminação microbiológica é um risco significativo, especialmente nas etapas de desossa, onde o contato com equipamentos e manipuladores pode comprometer a qualidade e segurança dos alimentos se não forem adotadas práticas higiênicas adequadas. A *Escherichia coli* é um indicador importante de contaminação fecal e pode ser usada para avaliar a eficácia das medidas higiênicas-sanitárias. Algumas cepas de *E. coli* possuem fatores de virulência que representam riscos à segurança dos alimentos como as estirpes diarreiogênicas EPEC, STEC, EHEC, EIEC, EAEC e ETEC. Dessa forma, a quantificação, isolamento e caracterização da *E. coli* e seus fatores de virulência são fundamentais para subsidiar os setores de controle e garantia da qualidade das indústrias avícolas, atuando também como um alerta para a possível presença de outros patógenos, como a *Salmonella spp.* O estudo teve como objetivo quantificar e caracterizar cepas diarreiogênicas de *E. coli* em filés de peito de frango inspecionados e comercializados

---

[1] Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. amanda.nascimento@ufnt.edu.br

[1] Professor Doutor da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Orientador do projeto de Iniciação Científica. jose.carlos@ufnt.edu.br



em supermercados de Araguaína. A metodologia utilizada incluiu coleta e análise laboratorial das amostras, extração de DNA e testes biomoleculares para identificação de patótipos específicos.

**Palavras-chave:** Contaminação, *Escherichia coli*, Filé de peito de frango

## I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A carne de frango é amplamente consumida no Brasil e a avicultura comercial é uma das principais atividades econômicas do país, inclusive na região norte do estado do Tocantins, onde um grande estabelecimento abate cerca de 90 mil aves diariamente em três turnos. Esse estabelecimento está sujeito à inspeção estadual e adere ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal, fornecendo carne de frango para os mercados do Tocantins, Maranhão e Pará.

Sabe-se que a manipulação dos produtos de origem animal contribui para a inclusão de contaminantes microbiológicos. Nesse contexto, a presença de *Escherichia coli*, uma indicação de contaminação fecal, pode ser utilizada para verificar se medidas higiênico-sanitárias adequadas estão sendo adotadas pelos manipuladores durante a desossa. Além disso, muitas cepas de *E. coli* podem conter fatores de virulência que representam um risco para a segurança alimentar, especialmente as estirpes diarreiogênicas, como enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina shiga (STEC), enterohemorrágica (EHEC), interoinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e enterotoxigênica (ETEC).

Dessa forma, quantificar, isolar e caracterizar *E. coli* e sua virulência pode subsidiar o trabalho preventivo dos setores de controle e garantia da qualidade das indústrias e pode ser sentinela para a possível presença de outros enteropatógenos de interesse para a sanidade animal e saúde pública, como a *Salmonella* spp., por exemplo.



## II. BASE TEÓRICA

Filés de peito de frango são produtos intensamente manipulados na cadeia produtiva, predispondo esse tipo de produto a sofrer grande contaminação ocasionalmente por micro-organismos capazes de causar infecções, sintetizar toxinas, além de outros patógenos muito relacionados com DTAs, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (LIMA, 2022).

## III. OBJETIVOS

Quantificar *Escherichia coli* e caracterizar, por abordagem biomolecular, os fatores de virulência de estirpes diarreio gênicas em filé de peito de frango regularmente produzido, inspecionado e comercializado em supermercados de Araguaína.

## IV. METODOLOGIA

As 20 amostras avaliadas de filé de peito de frango foram produzidas em Aguiarnópolis, norte do Tocantins, e comercializadas em supermercados de Araguaína. As coletas foram realizadas conforme as datas descritas no plano de trabalho.

Amostras de 1kg cada, em prazo legal de validade, foram adquiridas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  em sua embalagem original. As amostras foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), campus Araguaína, onde foram imediatamente analisadas.

De cada amostra foi retirada assepticamente uma alíquota de 25g representativa de toda a peça do produto, que foi homogeneizada em *Stomacher* com 225mL de água peptonada tamponada ( $\text{H}_2\text{O}_p$ ) por 180 segundos em saco plástico tipo Bag



estéril. A alíquota diluída em H<sub>2</sub>O (10<sup>-1</sup>) foi diluída decimal e sequencialmente até a diluição 10<sup>-9</sup> em solução salina (0,85%) peptonada (0,001%).

As diluições decimais seriadas foram inoculadas em Compact Dry<sup>®</sup> EC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão), conforme as recomendações do fabricante, e incubadas a 35 ± 1°C por 48 horas. Para quantificação de *E. coli*, foram consideradas somente as colônias azuis e o efeito da diluição decimal seriada.

Todos os isolados típicos foram primeiramente recuperados em caldo cérebro-coração (BHI) e submetidos à extração de DNA genômico (gDNA) conforme Ribeiro Júnior et al. (2016) para análise em PCR com alvo aos genes codificadores dos fatores de virulência de *E. coli* utilizando os *primers* e condições de amplificação descritos por Aranda et al. (2004) e apresentados no Quadro 1.

As PCRs foram realizadas em dois ensaios multiplex para cada isolado de acordo com a seguinte constituição: 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada dNTP, 2,5 µL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol/L de cada *primer*, 2,5 U de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador (BioRad) utilizando os protocolos descritos no Quadro 1. Os produtos então amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em solução de brometo de etídio a 20mg/L por 20m e documentados sob luz ultravioleta. No Quadro 1 estão representados os *amplicons* característicos de cada patótipo de *E. coli* pesquisado, exceção de EHEC, para o qual foram considerados os isolados que apresentarem o gene *eaeA* simultaneamente com o gene *stx1* e/ou 2.



**Quadro 1.** Genes que codificam fatores de virulência de *Escherichia coli*, primers iniciadores, produtos esperados e condições de amplificação conforme Aranda et al.

Gene	Primers	pb	<i>E. coli</i>	Amplificação
<i>eaeA</i>	CTGAACGGCGATTACGGAAG	917	EPEC	95°C-5m 40x (95°C-40s, 58°C-60s, 72°C-2m) 72°C-7m
	CCAGACGATACGATCCAG			
<i>CVD</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	EAEC	95°C-5m 40x (95°C-45s, 50°C-60s, 72°C-1m) 72°C-7m
	CAATGTGATAGAGGAATGTT			
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	STEC	
	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
<i>stx2</i>	GGCATGTCAGTGGATGCCTC	255	STEC	
	TGCAGTTACTCTGATGCTG			
<i>LT</i>	GGCGAAGGACAGGACCAAGT	450	ETEC	
	CGGCTTCTATATTATGCATCTG			
<i>ST</i>	ATTTTMTTITCTGTATTGTCT	190	ETEC	
	CACCCGGATCAARCGAATT			
<i>ipaH</i>	GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600	EIEC	
	GCCGCTGACGCCCTGTCAGAGTAC			

Fonte: Arquivo pessoal

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 amostras avaliadas, a quantificação média de *E. coli* observada foi de 2,5 UFC/g, com resultados variando de <10 a 30 UFC/g. Vale-se destacar que 9 (75%) das 12 amostras apresentaram resultados de quantificação < 10 UFC/g, sendo as amostras nº 9 e 10 as únicas que apresentaram contagens superiores ao limite de detecção (10 UFC/g), com resultado de 10 e 20 UFC/g de *E. coli*, respectivamente.

Dessas amostras, foram recuperados apenas 7 isolados de *E. coli* das placas das contagens das duas amostras, os quais foram submetidos à extração de DNA e aos



dois ensaios multiplex previstos. Do total de isolados, apenas 1 (25%) foi positivo para o gene *ipaH*, indicando uma cepa de EIEC e 6 foram positivo para a cepa EPEC.

A baixa quantificação de *E. coli* indica qualidade higiênico-operacional durante as etapas de produção e armazenamento. Apesar da identificação de um isolado patogênico, o risco ao consumo pode ser considerado baixo, até o presente momento.

## VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados finais obtidos indicam a presença de *E. coli* em uma parte das amostras avaliadas, o que ressalta a importância da avaliação microbiológica dos produtos de origem animal, como o filé de peito de frango. A identificação de uma amostra positiva para *E. coli* patogênica é uma preocupação adicional, destacando a importância de avaliar não somente a presença da bactéria, mas também seus potenciais fatores de virulência que pode representar um risco significativo para a saúde pública. A detecção de *E. coli* sugere a necessidade contínua de implementação e monitoramento rigoroso de medidas higiênico-sanitárias ao longo da cadeia produtiva.

## VII. REFERÊNCIAS

**ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A.** Bacterial quality of raw milk investigated by Escherichia coli and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, v. 20, n. 10, p. 913-917, 2009.

**ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES NETO, U.; SCALETSKY, I. C.** Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

**BRASIL.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 10.468 de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, que dispõe sobre o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.



**DOUËLLOU, T.; DELANNOY, S.; GANET, S.; et al.** Molecular characterization of O157, O26 and O103 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products. **Int J Food Microbiol**, v. 253, p. 59–65, 2017.

**GALLE, V.; RACHOR, E.; CORONEL, D. A.; et al.** Vantagem comparativa revelada da indústria da carne de frango brasileira e dos principais players (2009-2016). **Rev Elet Cient UERGS**, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2020.

**GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; et al.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol**, v. 47, p. 3-30, 2016.

**MACHADO-MOREIRA, B.; RICHARDS, K.; BRENNAN, F.; et al.** Microbial contamination of fresh produce: What, where, and how?. **Comprehensive Rev in Food Sci and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1727-1750, 2019.

**NATARO, J. P.; KAPER, J. B.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 142-201, 1998.

**OLIVEIRA NUNES, J. E.; DA SILVA, J. M.; DA SILVA ARAÚJO, L.; et al.** Análise de grafos de visibilidade do mercado brasileiro de soja, milho e carne de frango. **Res Society Develop**, v. 10, n. 1, p. e39210111478-e39210111478, 2021.

**RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SOARES, B. F.; et al.** Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semin-Cienc. Agrar.**, v. 37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.

**WANJALA, W. N.; NDUKO, J. M.; MWENDE, M. C.** Coliforms Contamination and Hygienic Status of Milk Chain in Emerging Economies. **J Food Qual Haz Control**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2018.

## VIII. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPT – Governo do Tocantins. O apoio foi realizado com a concessão da bolsa.