



PESQUISA DE ESTIRPES DIARREIOGÊNICAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) NO LEITE CRU REFRIGERADO PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS

BATISTA, Marco Aurelio Carneiro¹; **LOBO**, Cátia Maria Oliveira²; **JÚNIOR**, José Carlos Ribeiro³

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) com potencial fenotípico para produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em amostras de leite cru refrigerado produzido no norte do Tocantins. Foram coletadas 80 amostras diretamente de tanques de expansão de uso exclusivo em propriedades rurais. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins. As amostras foram cultivadas em meios CompactDry® EC e submetidas à caracterização molecular por PCR multiplex, utilizando *primers* descritos por Aranda, Fagundes Neto & Scaletsky (2004), visando detectar genes de virulência relacionados a diferentes grupos de *E. coli* diarreiogênica. A quantificação bacteriana foi acompanhada de análises estatísticas. Todas as amostras analisadas

1 Voluntário do Programa de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. marco.batista@ufnt.edu.br.

2 Professora Doutora da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. catia.lobo@ufnt.edu.br

3 Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. jose.carlos@ufnt.edu.br



apresentaram resultado negativo para estirpes diarreiogênicas produtoras de ESBL. Porém a presença de outras estirpes diarreiogênicas no leite cru demonstra a necessidade da implementação de práticas higiênicas na ordenha, armazenamento, transporte e expedição do leite, aplicando medidas preventivas para garantir a segurança alimentar. Os resultados obtidos contribuem para a construção de uma base científica regional sobre a ocorrência de microrganismos de importância em saúde pública, reforçando a importância da vigilância microbiológica e da educação sanitária na cadeia produtiva do leite no Tocantins.

Palavras-chave: ESBL, resistência antimicrobiana, segurança alimentar.

I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O leite cru, por ser um alimento amplamente consumido, pode se tornar um importante veículo de patógenos quando não obtido e manipulado sob condições higiênico-sanitárias adequadas, representando risco de surtos alimentares. O comércio informal de alimentos e o significativo risco de determinados patógenos alimentares tornam a vigilância microbiológica essencial. Nesse contexto, o estudo buscou compreender o perfil de contaminação do leite cru e o potencial de disseminação de cepas resistentes, contribuindo com informações relevantes para políticas públicas e práticas seguras na cadeia produtiva.

II. BASE TEÓRICA

A fundamentação teórica baseou-se em estudos nacionais e internacionais sobre *E. coli* diarreiogênica e resistência antimicrobiana. Gomes et al. (2016) e Wanjala et al. (2018) descreveram os principais grupos patogênicos de *E. coli* e sua relevância em saúde pública. Campos et al. (2018) e Ribeiro Júnior et al. (2019) destacaram a



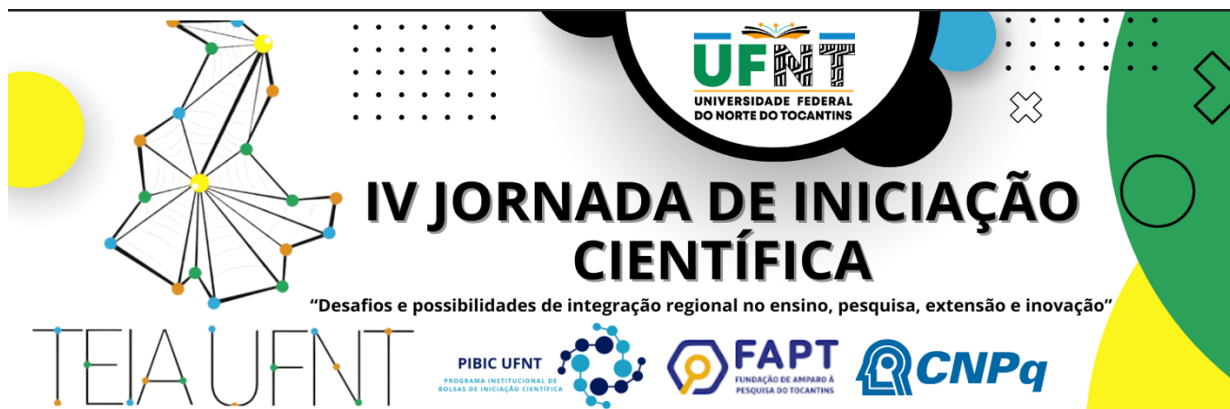
presença de cepas resistentes em produtos lácteos e os riscos associados ao consumo de leite cru. Jenkins et al. (2022) e Sebastianski et al. (2022) discutiram falhas no processamento e na pasteurização, ressaltando a importância de boas práticas de fabricação. O método de detecção dos genes de virulência seguiu a padronização de Aranda, Fagundes Neto & Scaletsky (2004), utilizando PCR multiplex para diagnóstico de DECs. Além disso, as diretrizes do CLSI (2016) serviram de referência para os testes de susceptibilidade antimicrobiana. Esses autores embasaram a metodologia empregada e a análise dos resultados, permitindo estabelecer um paralelo entre a realidade regional e o panorama nacional sobre a qualidade microbiológica do leite cru.

III. OBJETIVOS

Verificar a ocorrência de isolados de *Escherichia coli* diarreio gênica com potencial fenotípico de produção de beta lactamase de espectro estendido (ESBL) a partir de isolados recuperados de leite cru refrigerado produzido no norte do Tocantins.

IV. METODOLOGIA

Foram avaliadas 80 amostras de leite cru refrigerado distintas. As amostras foram coletadas de forma asséptica diretamente nos tanques de expansão de uso individual das propriedades situadas no Tocantins. 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. Diluições decimais seriadas diluídas em solução salina (0,85%) peptonada (0,001%) foram realizadas. A alíquota de 1 mL de cada amostra foi inoculada em CompactDry® EC (NissuiPharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão) e incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Foram considerados típicas as colônias que



apresentaram coloração azul, conforme as orientações do fabricante. Foram recuperados 30 isolados de cada amostra de leite. Os isolados foram cultivados em caldo cérebro-coração (BHI) e submetidos à extração de DNA total por fervura simples (Ribeiro Júnior et al., 2016). Os produtos de extração foram quantificados no NanoDrop Lite Plus (ThermoFisher). Cinquenta ng de DNA template foram adicionados a 100 nM de cada dNTP, 2,5 µL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl₂, 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. Os *primers* utilizados em cada ensaio multiplex estão apresentados no Quadro 1 e foram obtidos do estudo de Aranda, Fagundes Neto & Scaletsky (2004). Os amplicons foram verificados em gel de agarose a 2,5% e documentados sob luz ultravioleta após o período de amplificação executado no termociclador (MiniAmplifier, ThermoFisher). As condições de amplificação de cada ensaio multiplex descrito por Aranda, Fagundes Neto & Scaletsky (2004) também estão apresentadas no Quadro 1. Aquelas que apresentaram resultado positivo no teste qualitativo de pesquisa dos genes que codificam fatores de virulência foram recuperadas em placas de ágar PCA por repiques sucessivos. As amostras foram submetidas à cultura específica e quantificação de *E. coli* por métodos microbiológicos tradicionais (CompactDry EC, NissuiPharmaceutical) e caracterização dos fatores de virulência utilizando os ensaios moleculares que possibilitassem correlacionar o método de análise direto com o resultado qualitativo da presença ou ausência do agente etiológico na cultura. Os resultados foram tabulados e comparados e determinado o coeficiente de correlação Kappa e o teste de Qui-Quadrado no software Statistica v. 5.6 (StatSoft).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO



As análises microbiológicas e moleculares demonstraram que nenhuma das amostras de leite cru refrigerado avaliadas apresentou estirpes de *Escherichia coli* diarreio gênicas produtoras de ESBL. Entretanto a presença de outras estirpes de *E. coli* nas amostras avaliadas demonstra a necessidade de implementação medidas higiênico - sanitárias desde a ordenha até a expedição a fim de que se obtenha uma matéria-prima de qualidade para elaboração de derivados lácteos que não ofereçam riscos à saúde pública. Os resultados contribuem para o fortalecimento da vigilância sanitária e oferecem dados científicos regionais que podem subsidiar políticas públicas voltadas à segurança dos alimentos e à prevenção de doenças.

VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que as amostras de leite cru refrigerado produzidas no Norte do Tocantins e avaliadas neste trabalho não apresentaram estirpes diarreio gênicas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL o que não afasta a necessidade de atenção contínua quanto à segurança do leite cru devido a detecção de outras estirpes de *E. coli*. Os resultados apontam a importância do controle microbiológico em produtos de origem animal destinados ao consumo humano a fim de se conhecer não somente a diversidade microbiológica, mas também seus potenciais fatores de virulência que podem representar um risco à saúde pública. Dados desta natureza colaboram na construção de documentos que auxiliam em escolhas para a construção de uma base científica regional, reforçando a importância de políticas públicas de vigilância e prevenção voltadas à saúde do consumidor

VII. REFERÊNCIAS



Aranda KRS, Fagundes Neto U&Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

Beloti V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. 1ª Ed., Londrina: Editora Planta, 516p., 2015. Campos AC et al. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 94- 100, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; 21st Informational Supplement. CLSI document M100- S21. Wayne, PA: CLSI, 2016.

Gomes TA et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3- 30, 2016.

Jenkins C et al. Outbreak of STEC O157: H7 linked to a milk pasteurisation failure at a dairy farm in England, 2019. **Epidemiology & Infection**, v. 150, e114, 2022.

Ribeiro Júnior JC et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3069- 3078, 2016.

Ribeiro Júnior JC et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10850-10854, 2019.



Sebastianski M et al. Disease outbreaks linked to pasteurized and unpasteurized dairy products in Canada and the United States: a systematic review. **Canadian Journal of Public Health**, v. 113, n. 4, p. 569-578, 2019.

Wanjala WN, Nduko JM & Mwende MC. Coliforms Contamination and Hygienic Status of Milk Chain in Emerging Economies. **Journal of Food Quality and Hazard Control**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2018

VIII. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Norte do Tocantins – UFNT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite – INCT LEITE e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.