



DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DO LEITE CRU REFRIGERADO PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS

SILVA, João Pedro Cabral¹; **LOBO**, Cátia Maria de Oliveira ²; **JÚNIOR**, José Carlos Ribeiro³

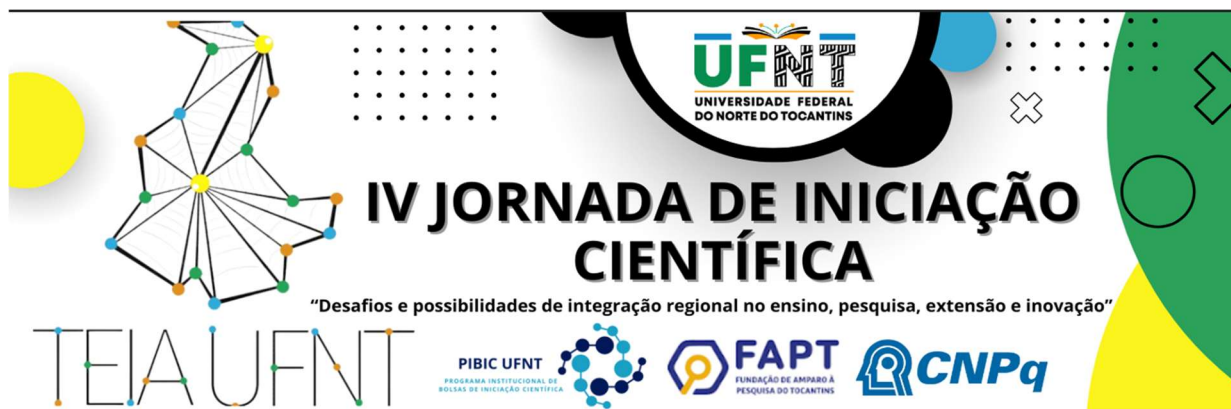
RESUMO

Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de leite cru refrigerado provenientes da região norte do Tocantins, avaliando também a presença de genes de virulência e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dessas cepas. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Norte do Tocantins, utilizando métodos microbiológicos e biomoleculares para detecção e caracterização das amostras. Foram coletadas 80 amostras de leite cru diretamente dos tanques de expansão de propriedades leiteiras, seguindo procedimentos assépticos. As amostras foram processadas em placas Compact Dry EC, incubadas a 35 °C por 24 horas, e as colônias características de *E. coli* foram purificadas em ágar MacConkey. A extração de DNA genômico foi realizada

1 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. joao.cabral@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



para amplificação, por PCR uni e multiplex, dos genes *stx1* e *stx2*, que codificam as toxinas Shiga. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença dos genes de virulência. As cepas confirmadas como STEC foram posteriormente submetidas a testes de suscetibilidade antimicrobiana segundo a metodologia de difusão em disco proposta por Bauer et al. (1966) e interpretadas conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Demonstrou-se, através dos resultados obtidos a presença de STEC em 56% das amostras analisadas, totalizando 1.270 isolados de *E. coli*, dos quais 11,6% apresentaram positividade para o gene *stx1* e 5,2% para o gene *stx2*. Entre as cepas *stx1* positivas, observou-se resistência a tetraciclina (50%), estreptomicina (25%) e amoxicilina + ácido clavulânico (25%). Já as cepas *stx2* demonstraram maior resistência à tetraciclina (80%), além de resistência variável à ampicilina, cefoxitina, estreptomicina e ácido nalidíxico. Obteve-se uma elevada taxa de contaminação do leite cru por *E. coli* produtora de toxina Shiga gerando uma preocupação adicional com o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Desta forma, reforça-se a necessidade de adoção de práticas higiênico-sanitárias rigorosas durante a produção e o armazenamento do leite, bem como o monitoramento contínuo da qualidade microbiológica na cadeia produtiva de laticínios, a fim de garantir a segurança alimentar e proteção da saúde pública.

Palavras-chave: Leite Cru. Resistência Microbiana. Segurança Alimentar.

I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

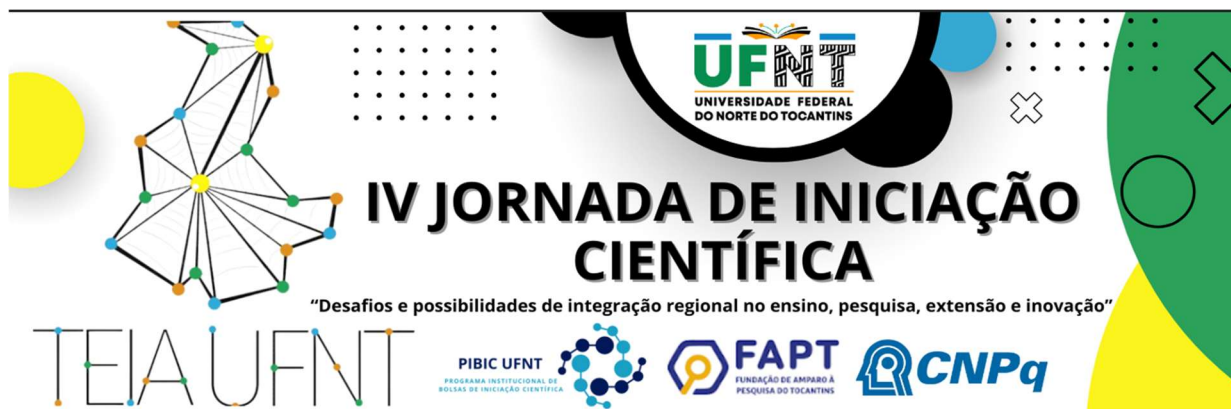
O Brasil é um país de grandes proporções e há diferenças significativas na qualidade do leite das diversas regiões do país (Ribeiro Júnior et al., 2015). No Brasil, cerca de 20% da produção de leite vem de pequenos produtores familiares cujas propriedades se caracterizam por baixos índices zootécnicos e qualidade deficiente do produto, que



apresenta altas contagens microbiológicas e, conseqüentemente, comprometimento do potencial tecnológico em toda a cadeia de laticínios (Lima et al., 2020). Algumas cepas diarreio gênicas de *E. coli*, como a STEC, têm como habitat natural o trato gastrointestinal de bovinos. A adoção de práticas higiênicas durante a ordenha e o processamento do leite é crucial para reduzir a presença desse patógeno (Beloti, 2015). Entre as cepas mais preocupantes estão as diarreio gênicas, como a enteropatogênica (EPEC), a produtora de toxina Shiga (STEC), a enterohemorrágica (EHEC), a enteroinvasiva (EIEC), a enteroagregativa (EAEC) e a enterotoxigênica (ETEC) (Gomes et al., 2016; Wanjala, Nduko & Mwende, 2018). Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana desses microrganismos é essencial para orientar intervenções quimi-oterápicas eficazes.

II. BASE TEÓRICA

Fundamenta-se na importância da qualidade microbiológica do leite cru e nos riscos associados à presença de microrganismos patogênicos, especialmente *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). A *Escherichia coli* é amplamente reconhecida como um microrganismo indicador de contaminação fecal, sendo parte da microbiota intestinal de animais e humanos. No entanto, algumas linhagens desenvolveram fatores de virulência que as tornam patogênicas, podendo causar doenças graves em humanos (Gomes et al., 2016). Entre essas linhagens destacam-se os patótipos diarreio gênicos, como a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e a produtora de toxina Shiga (STEC), também conhecida como *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), capaz de produzir as toxinas STX1 e STX2 (Wanjala, Nduko & Mwende, 2018). A infecção humana por STEC está frequentemente associada ao consumo de alimentos contaminados de origem animal, incluindo leite cru e seus derivados, podendo causar



diarreia, colite hemorrágica e, em casos mais graves, síndrome hemolítico-urêmica (Tack et al., 2021). Estudos internacionais, como os de Waltenburg et al. (2022), reforçam a recorrência de surtos alimentares provocados por cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga, destacando sua relevância epidemiológica. Além do risco infeccioso, outro aspecto preocupante é a resistência antimicrobiana observada em cepas de *E. coli* isoladas de alimentos, fenômeno que compromete a eficácia de tratamentos clínicos e representa um desafio crescente para a saúde pública (Campos et al., 2018).

OBJETIVOS

Identificar a presença de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em leite cru refrigerado proveniente da região norte do Tocantins, utilizando técnicas microbiológicas e biomoleculares para detecção de genes associados a fatores de virulência.

III. METODOLOGIA

Foram coletadas 80 amostras de leite cru (50 mL cada) diretamente dos tanques de expansão/resfriamento, em frascos estéreis e de forma asséptica. As amostras foram diluídas em solução salina peptonada (0,85% + 0,001%) e semeadas em placas Compact Dry EC (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japão), seguindo as recomendações do fabricante. Após incubação a 35 °C por 24 h, foram realizadas as contagens de coliformes totais e *Escherichia coli*. Os isolados de *E. coli* foram recuperados em caldo cérebro-coração (BHI) e purificados em ágar MacConkey. A caracterização dos patótipos diarreiogênicos foi feita por PCR uni e multiplex, com extração de DNA segundo Ribeiro Júnior et al. (2016) e primers descritos por Aranda et al. (2004). A amplificação foi conduzida em termociclador BioRad, e os produtos analisados por



eletroforese em gel de agarose 2,5%, corados com brometo de etídio (20 mg/L). Os isolados de *E. coli* produtores de toxina Shiga (STEC) foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco (Bauer et al., 1966), conforme recomendações do CLSI (2016). Foram testados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina + ácido clavulânico, aztreonam, tetraciclina, cefotaxima, cefoxitina, ácido nalidíxico, gentamicina, cloranfenicol, ampicilina, ciprofloxacina e estreptomicina.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Demonstrou-se, através dos resultados deste estudo, a presença significativa de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de leite cru refrigerado provenientes da região norte do Tocantins, evidenciando um potencial risco à saúde pública e à qualidade microbiológica do produto. Das 80 amostras analisadas, 56% apresentaram resultados positivos para a presença de STEC, totalizando 1.270 isolados de *E. coli*, dos quais 11,6% foram positivos para o gene *stx1* e 5,2% para o gene *stx2*. Esses achados confirmam a ampla disseminação de *E. coli* patogênica em produtos de origem animal, como já relatado por Nunes et al. (2024) e Santos et al. (2024), que observaram resultados semelhantes em alimentos comercializados no norte do Tocantins. A análise de sensibilidade antimicrobiana revelou diferentes perfis de resistência entre as cepas positivas. Entre as portadoras do gene *stx1*, verificou-se resistência à tetraciclina (50%), estreptomicina (25%) e amoxicilina + ácido clavulânico (25%). Já as cepas *stx2* demonstraram taxas mais elevadas de resistência, principalmente à tetraciclina (80%), seguidas por ampicilina (40%), ácido nalidíxico (40%), cefoxitina (20%), estreptomicina (20%) e amoxicilina + ácido clavulânico (20%). De acordo com Gomes et al. (2016) e Tack et al. (2021), a ocorrência de cepas STEC resistentes tem sido associada ao aumento de casos de



doenças transmitidas por alimentos (DTAs), reforçando a necessidade de monitoramento contínuo desses patógenos.

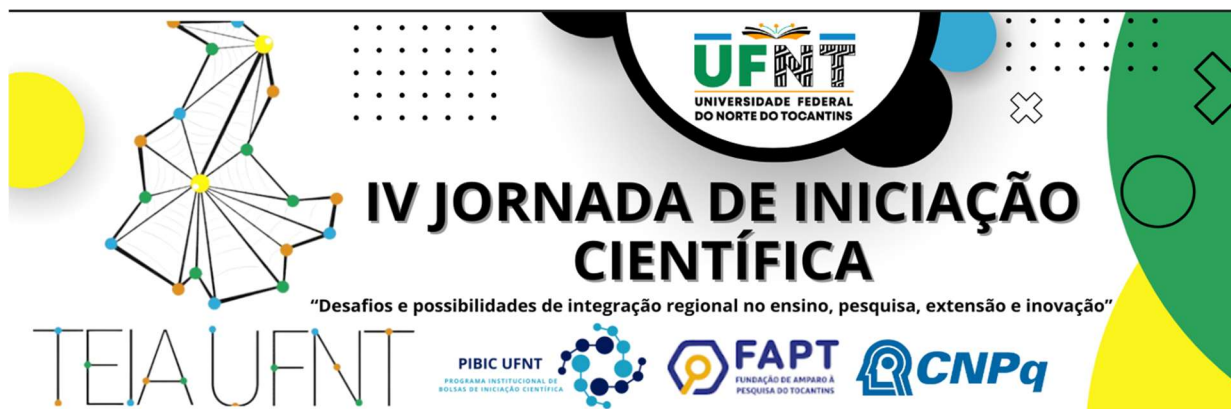
V. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em 56% das amostras de leite cru coletadas, evidencia a importância da investigação da qualidade microbiológica em laticínios, a fim de embasar medidas que visem à melhoria da qualidade do leite desde a etapa de produção. A presença de *E. coli* patogênica e resistente a determinados antibióticos é um alerta importante que mostra a necessidade de ir além da simples detecção da bactéria e investigar seus possíveis fatores de virulência, que podem oferecer riscos à saúde pública. Nesse sentido ressalta-se a importância de adotar medidas rigorosas de higiene e controle sanitário em toda a cadeia de produção a fim de assegurar a qualidade e a segurança dos alimentos para o consumidor final. Conclui-se que há urgência na implementação de programas de controle de qualidade e biossegurança nas propriedades rurais e laticínios locais, além de políticas públicas que incentivem a educação sanitária de pequenos produtores, a fim de reduzir a contaminação microbiológica e prevenir riscos à saúde do consumidor.

VI. REFERÊNCIAS

Altalhi AD & Hassan SA. 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 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.



Bauer AW et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n. 4, p. 493–496, 1996.

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.

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.

Tack DM et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks in the United States, 2010– 2017. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1529, 2021.

Waltenburg MA et al. Two multistate outbreaks of a reoccurring Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain associated with romaine lettuce: USA, 2018–2019. **Epidemiology & Infection**, v. 150, e16, 2022.

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.

VII. 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.