



**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA MOLECULAR DIRETA PARA DETERMINAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICA NO LEITE CRU INDEPENDENTE DE CULTURA BACTERIOLÓGICA**

**NASCIMENTO, Amanda<sup>1</sup>; LOBO, Cátia<sup>2</sup>; RIBEIRO JÚNIOR, José<sup>3</sup>**

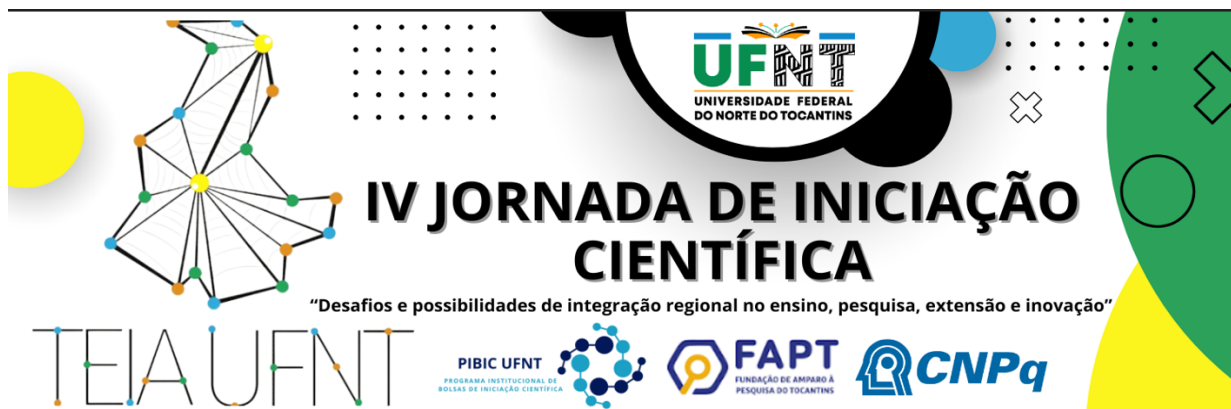
**RESUMO**

Objetivou-se com este trabalho desenvolver um método molecular rápido para detecção direta de *Escherichia coli* diarreiogênica em leite cru refrigerado, independente de cultura microbiológica. Para isso, foram analisadas 38 amostras de leite cru provenientes da região norte do Tocantins, utilizando extração de DNA por membranas de 0,22 µm e PCR convencional multiplex para detecção de genes de virulência. Demonstrou-se através dos resultados a presença de genes de virulência em parte das amostras: stx1 foi detectado em 7 amostras (18%), stx2 em 4 amostras (10,5%) e gene Eae em 2 amostras (5,3%). A metodologia molecular mostrou-se eficaz na triagem rápida de *E. coli* diarreiogênica, complementando os métodos tradicionais de cultivo. Conclui-se que a técnica desenvolvida neste trabalho representa uma alternativa viável para o monitoramento microbiológico do leite cru, oferecendo maior agilidade nos resultados e contribuindo para a segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e seus derivados.

**Palavras-chave:** PCR, leite cru, *Escherichia coli*, detecção molecular.

---

1 Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Araguaína-TO. amanda.nascimento@ufnt.edu.br.



## I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Métodos moleculares constituem ferramentas fundamentais para identificação e caracterização genética de vários tipos de patógenos humanos, veterinários, ambientais, etc. São amplamente utilizados para diagnóstico de doenças, já que apresentam alta sensibilidade e especificidade. Organismos que apresentam material genético podem ser identificados através de exames moleculares simples, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Islam et al., 2023).

A aplicação de métodos moleculares diretos na indústria de alimentos apresenta limitações quando se trata em atestar a segurança para o consumo. Isso devido, em alguns casos, à própria metodologia em si. A detecção do material genético de um determinado micro-organismo em um alimento não corresponde a viabilidade da célula bacteriana ou da partícula viral, por exemplo. Desta forma, mesmo com resultados positivos, não se pode afirmar sobre o real risco ao consumo do alimento (Kamiloglu et al., 2020). Por isso, métodos que fazem a cultura bacteriológica ainda são amplamente empregados no controle de qualidade das empresas, laboratórios públicos, privados e são exigidos pelas legislações que regulam a qualidade microbiológica dos alimentos (Brasil, 2022). No entanto, esses cultivos podem ser onerosos e necessitem de um longo tempo de incubação, o que muitas vezes inviabiliza sua execução.

*Escherichia coli* além de ser um importante indicador de contaminação, pode apresentar elevada patogenicidade, sendo responsável por inúmeros surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), tendo como principal origem os produtos de origem animal (Aranda et al., 2004; Nunes et al., 2024).

Dessa forma, estudos capazes de isolar e caracterizar patógenos de forma rápida em alimentos, como o leite cru, que pode veicular diversos patógenos, como a *Escherichia coli* (Beloti, 2015) são fundamentais para a implementação de programas



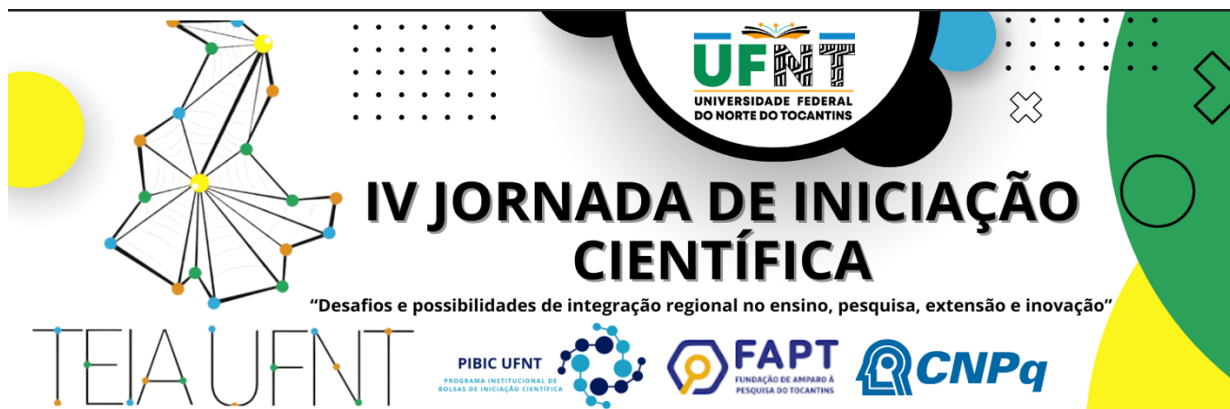
que objetivam a segurança dos alimentos, além de serem alternativas para uma melhor triagem e destinação de leite nas indústrias.

## II. BASE TEÓRICA

Durante a execução deste trabalho, o embasamento teórico foi construído a partir de pesquisa bibliográfica contemplando diversos autores que abordam a aplicação de métodos moleculares na detecção de patógenos em alimentos, em especial *Escherichia coli* diarreiogênica, bem como a importância dessas metodologias para a segurança alimentar. Islam et al. (2023) destacam que as técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são ferramentas de alta sensibilidade e especificidade, fundamentais para o diagnóstico rápido e preciso de micro-organismos em diferentes matrizes, incluindo alimentos. No entanto, Kamiloglu et al. (2020) aponta que a detecção do DNA microbiano por métodos moleculares não garante a viabilidade celular do agente.

Beloti (2015) ressalta que o leite cru pode ser um importante veículo de transmissão de patógenos, incluindo *Escherichia coli*, reforçando a necessidade de estratégias de monitoramento e controle microbiológico eficazes. Já Fagnani, Nero e Rosolem (2021) enfatizam a importância da educação sanitária e do conhecimento técnico como meios de reduzir os riscos associados ao consumo de leite cru e seus derivados, reforçando o impacto dessas pesquisas na saúde pública.

A fundamentação metodológica foi baseada principalmente nos estudos de Aranda, Fagundes Neto e Scaletsky (2004), que desenvolveram protocolos de PCR



multiplex para detecção simultânea de diferentes genes de virulência em *E. coli* diarréio-gênica, e Gomes et al. (2016), descrevem a caracterização molecular das principais categorias dessa bactéria.

### III. OBJETIVOS

Objetivou-se neste estudo desenvolver um método molecular de execução rápida e independente de cultura microbiológica para a identificação direta de estirpes diarréio-gênica de *Escherichia coli* no leite cru refrigerado.

### IV. METODOLOGIA

Foram avaliadas 38 amostras de leite cru oriundas de produtores da região norte do Tocantins. Amostras de 1000 mL de leite cru foram coletadas diretamente do tanque de resfriamento. Estas eram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), campus Araguaína e imediatamente analisadas. De cada amostra foi retirada assepticamente uma alíquota de 25ml que foi homogeneizada em *Stomacher* com 225mL de água peptonada tamponada (H2Op) por 180 segundos em saco plástico tipo *bag* estéril. Procedeu-se então a incubação em estufas bacteriológicas a 35° por 24 horas. Após o período de recuperação e aumento da população microbiana, a mistura foi homogeneizada e uma alíquota de 1mL foi retirada para extração de DNA, conforme Ribeiro Júnior et al., 2016. As amostras de DNA extraídas foram testadas em PCR clássica para a pesquisa de estirpes de *E. coli* diarréio-gênica. Foram avaliadas *E. coli* enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina shiga (STEC), enterohemorrágica (EHEC), interoinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e enterotoxigênica (ETEC) (Gomes et al., 2016). Para PCR utilizou-se 5 µL de DNA



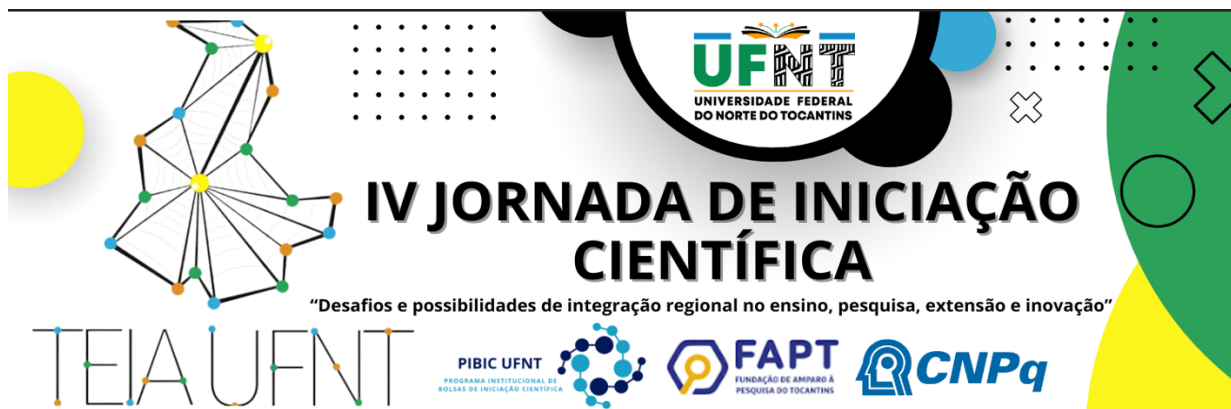
template na concentração de 10 ng/ $\mu$ L adicionados a 100 nM de cada dNTP, 2,5  $\mu$ L de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol/L de cada primer, 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura para completar o volume final de 25  $\mu$ L. Os primers utilizados em cada ensaio multiplex estão apresentados no Quadro 1 e foram obtidos do estudo de Aranda et al. (2004). Os amplicons foram verificados em gel de agarose a 2,5% e documentados sob luz ultravioleta após o período de amplificação em termociclador (MiniAmplifier, ThermoFisher). As condições de amplificação de cada ensaio multiplex descrito por Aranda et al. (2004) também foram apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Genes que codificam fatores de virulência de *Escherichia coli*, primers iniciadores, produtos esperados e condições de amplificação conforme Aranda et al. (2004).

Gene	Primers	pb	<i>E. coli</i>	Amplificação
<i>eaeA</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA	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	
	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	STEC	
	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255		
	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
<i>LT</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	ETEC	
	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
<i>ST</i>	ATTTTMTTCTGTATRTCTT	190		
	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>ipaH</i>	GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600	EIEC	
	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 mesmos ensaios moleculares previstos no plano trabalho para que assim seja possível 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. Foi também



determinado o coeficiente de correlação Kappa e o teste de Qui-Quadrado no software Statistica v. 5.6 (StatSoft).

## VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciou-se através deste estudo a presença de *Escherichia coli* diarreio gênica em parte das amostras de leite cru avaliadas, com detecção de genes associados à virulência (como stx1, stx2 e Eae). Desta forma reforça-se a relevância da aplicação de metodologias moleculares como ferramenta rápida e eficiente para o monitoramento microbiológico, em complemento aos métodos tradicionais de cultura bacteriana. Demonstra-se através dos resultados apresentados a importância de ampliar o controle higiênico-sanitário ao longo da cadeia produtiva do leite, visto que a contaminação por *E. coli* patogênica representa risco significativo à saúde pública. Além disso, o projeto contribui para o desenvolvimento de alternativas de triagem mais ágeis, capazes de apoiar decisões relacionadas à segurança alimentar e ao destino industrial do leite cru. Em síntese, a pesquisa avança na construção de metodologias inovadoras que podem otimizar o monitoramento microbiológico de alimentos, promovendo maior segurança para o consumidor e fortalecendo práticas de qualidade na produção leiteira.

## VII. REFERÊNCIAS

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.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

BELOTI, V. Leite: **obtenção, inspeção e qualidade**. 1. ed. Londrina: Editora Planta, 2015. 516 p.



FAGNANI, R.; NERO, L. A.; ROSOLEM, C. P. Why knowledge is the best way to reduce the risks associated with raw milk and raw milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 88, n. 2, p. 238-243, 2021.

GOMES, T. A. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

ISLAM, S. et al. **Food microbial and molecular biology: from fundamentals to applications**. Boca Raton: CRC Press, 2023. 288 p.

KAMILOGLU, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332-349, 2020.

## 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.