UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

RODRIGO ARAÚJO DE MELO

DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *tetA e tetB* EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS.

BRASÍLIA, 2023

RODRIGO ARAÚJ O DE MELO

DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *tetA e tetB* EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS.

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Msc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Co-orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2023

RODRIGO ARAÚJO DE MELO

DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *tetA e tetB* EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
LETICIA FERNANDES SILVA RODRIGUES
Data: 20/12/2023 16:24:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Orientador(a): Profa. Msc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE – Universidade de Brasília)

Co-Orientador(a): Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE – Universidade de Brasília)

Farmacêutica Esp. Carla Azevedo Bilac
(FCE – Universidade de Brasília)

Farmacêutica Esp. Karolina Oliveira Gomes
(FCE – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

RESUMO

O queijo do tipo Minas Frescal artesanal é amplamente consumido no Brasil, porém esses queijos artesanais quando feitos a partir de leite cru podem apresentar contaminação por microrganismos patogênicos. A presença elevada de *Escherichia coli* nesses queijos indica falhas nas práticas de fabricação e higiene, representando um perigo à saúde, já que alguns sorotipos podem causar doenças alimentares graves. Este estudo teve como objetivo principal a detecção dos genes de resistência as tetraciclinas *tetA* e t*etB* em cepas de *E. coli* provenientes de queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente. Então, vinte e duas amostras de queijos Minas Frescal artesanais foram coletadas em feiras no Distrito Federal. Após o isolamento das cepas de *E. coli* dos queijos, o DNA bacteriano foi extraído dessas bactérias, sendo a quantidade e qualidade de DNA avaliadas pelo NanoDrop 2000, seguido por eletroforese em gel de agarose. A análise molecular incluiu a amplificação e visualização do material genético por PCR, com detecção de genes de identificação (*lacZB* e *uidA*) e de resistência (*tetA* e *tetB*). Das 92 cepas de *E. coli* analisadas, 63 cepas (68,47%) apresentaram os genes *tet*, sendo 39 cepas (42,39%) com presença dos genes *tetA* e *tetB*, 14 cepas com presença do gene *tetA* (15,22%) e 10 cepas (10,86%) com presença do gene *tetB*, indicando uma notável resistência às tetraciclinas. Estes resultados levantam preocupações sobre os queijos artesanais atuarem como potenciais fontes de disseminação desses genes de resistência às tetraciclinas, evidenciando a necessidade de medidas corretivas na produção e comercialização desses produtos.

Palavras-chave: queijo Minas Frescal, resistência às tetraciclinas, gene *lacZB*, gene *uidA*, gene *tetA*, gene *tetB*.

ABSTRACT

Artisanal Minas Frescal cheese is widely consumed in Brazil, however these artisanal cheeses, when made from raw milk, can be contaminated by pathogenic microorganisms. The high presence of *Escherichia coli* in these cheeses indicates failures in manufacturing and hygiene practices, representing a health hazard, as some serotypes can cause serious food-borne illnesses. This study's main objective was to detect the *tetA* and *tetB* tetracycline resistance genes in *E. coli* strains from artisanal Minas Frescal cheeses. Then, twenty-two samples of artisanal Minas Frescal cheeses were collected at public markets in the Federal District, Brazil. After the isolation of *E. coli* strains from cheeses, bacterial DNA was extracted from these bacteria, and the quantity and quality of DNA were assessed by NanoDrop 2000, followed by agarose gel electrophoresis. Molecular analysis included amplification and visualization of genetic material by PCR, with detection of identification (*lacZB* and *uidA*) and resistance (*tetA* and *tetB*) genes. Of the 92 *E. coli* strains analyzed, 63 strains (68.47%) presented the tet genes, 39 strains (42.39%) with the presence of the *tetA* and *tetB* genes, 14 strains with the presence of the *tetA* gene (15.22 %) and 10 strains (10.86%) with the presence of the *tetB* gene, indicating notable resistance to tetracyclines. These results raise concerns about artisanal cheeses acting as potential sources of dissemination of these tetracycline resistance genes, highlighting the need for corrective measures in the production and marketing of these products.

Keywords: Minas Frescal cheese, tetracycline resistance, *lacZB* gene, *uidA* gene, *tetA* gene, *tetB* gene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana à tetraciclina das cepas de Escherichia coli isoladas de queijos tipo Minas Frescal de produção artesanal...24
Tabela 2 - Perfis de multirresistência antimicrobiana dos isolados de Escherichia coli em amostras de queijo artesanal do tipo Minas Frescal. 25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do mecanismo de ação das tetraciclinas.....16
Figura 2 - Mecanismo de conjugação bacteriana, por maneira horizontal. 18
Figura 3 – Géis das padronizações dos genes *lacZB* e *uidA*. 30
Figura 4 – Géis das padronizações dos genes *tetA* e *tetB*. 32

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina E Ácido Clavulânico
APEC	*Escherichia Coli* Patogênica Aviária
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centro De Controle E Prevenção De Doenças
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CTX	Cefotaxima
EGM	Elementos Genéticos Móveis
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
MDR	multirresistência
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
STEC	*Escherichia Coli* Produtora De Toxina Shiga
SUL	Sulfonamidas
TET	Tetraciclina
THG	Transferência Horizontal Genética

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 REVISÃO DA LITERATURA 12
2.1 *ESCHERICHIA COLI* E DOENÇAS COM TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DTHA) 12
2.2 IMPORTÂNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR *ESCHERICHIA COLI* EM ANIMAIS PRODUTORES DE ALIMENTOS 13
2.3 QUEIJOS ARTESANAIS E OS PROBLEMAS DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA 14
2.4 *ESCHERICHIA COLI* E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS TETRACICLINAS 15
2.5 GENES DE RESISTÊNCIA ÀS TETRACICLINAS EM CEPAS DE *Escherichia coli* 17
3 OBJETIVOS 19
3.1 OBJETIVO GERAL 19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
4 JUSTIFICATIVA 20
5 MÉTODOS 21
5.1 COLETA DE AMOSTRAS 21
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES 21
5.3 ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO 21
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
7 CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados possuem quantidades apropriadas de proteínas contendo aminoácidos essenciais, gorduras e minerais (com destaque para cálcio e fósforo), o que demonstra sua importância na alimentação humana (Bastam *et al*., 2021).

Os queijos artesanais feitos a partir de leite cru podem apresentar contaminação por microrganismos patogênicos. Embora a comunidade bacteriana encontrada no leite cru possa contribuir de maneira positiva para o processo de produção e as características sensoriais dos queijos artesanais, é fundamental enfatizar que a ausência de condições sanitárias adequadas na produção do leite pode comprometer a qualidade e a segurança do produto (Santos *et al.*, 2023).

Dentre os tipos de queijos mais consumidos no Brasil, o queijo Minas Frescal está na terceira posição, e como seu nome sugere, é um queijo fresco, não maturado, de umidade muito elevada (mais de 55%) e com teor de gordura médio (Embrapa, 2019). Essas características oferecem um ambiente favorável para o crescimento bacteriano (Delorme *et al.*, 2020).

Os principais patógenos isolados de queijos são *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, que frequentemente causam surtos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (Saleh *et al.,* 2023).

Escherichia coli é um microrganismo comum no intestino de muitas espécies de animais, incluindo seres humanos e aves. Embora a maioria das cepas de *E. coli* seja inofensiva, uma minoria pode causar doenças nos seres humanos, a depender da presença de sorotipos patogênicos. As bactérias *E. coli* são abundantes em fezes humanas e de animais de sangue quente e, portanto, são regularmente usadas como indicadores microbianos de presença de bactérias enteropatogênicas em água e alimentos (Molina *et al.*, 2015).

Atualmente cepas de *E. coli* com resistência a antimicrobianos representam um grande problema de saúde pública, uma vez que essa resistência dificulta o tratamento de infecções causadas por essas bactérias. As tetraciclinas por exemplo são conhecidas por seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e a disseminação de mecanismos de resistência contra essa classe de medicamento limita seu uso no tratamento de infecções bacterianas (Grossman *et*

al., 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Escherichia coli* E DOENÇAS COM TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DTHA)

Escherichia coli é uma bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae,* possui morfologia em forma de bastonete reto, com aproximadamente 1-3 µm de comprimento e 0,4-0,7 µm de largura. Sua classificação é Gram-negativa, ou seja, não retém o violeta de genciana durante o processo de coloração de Gram. Além disso, *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa, o que significa que pode se desenvolver tanto na presença como na ausência de oxigênio. Sua mobilidade pode variar, sendo que a maioria dos sorotipos de *E. coli* são móveis e possuem flagelos peritríquios (Procop *et al*., 2017).

E. coli normalmente vive como comensal no intestino dos seres humanos e animais de sangue quente, podendo contribuir positivamente para a saúde intestinal. No entanto, existem sorotipos patogênicos de *E. coli* que podem causar doenças alimentares graves, como a *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). O sorotipo STEC pode contaminar alimentos ou água através do contato direto ou indireto com fezes de animais infectados, sendo o principal reservatório natural da bactéria o trato gastrointestinal do gado saudável. As bactérias eliminadas pelas fezes tendem a contaminar águas, bem como culturas de hortifrutigranjeiros e produtos de origem animal como leite cru. Para prevenir a contaminação dos alimentos por *E. coli* é importante manter um bom saneamento do ambiente, além de praticar medidas seguras de manipulação e preparação de alimentos (Who, 2018).

A infecção gastrointestinal causada por *E. coli* pode apresentar sintomas como fortes dores de estômago, diarreia sanguinolenta ou não, febre, náuseas e/ou vômitos. O sorotipo STEC pode causar complicações graves, como insuficiência renal pela síndrome hemolítico-urêmica (SHU). Qualquer pessoa pode ter infecção alimentar provocada por *E. coli*, mas alguns grupos têm maior probabilidade de desenvolver doença grave, como crianças menores de 5 anos, adultos com mais de 65 anos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (Bryan *et al*., 2015).

O tratamento da infecção gastrointestinal causada por *E. coli* envolve a hidratação oral equilibrada em eletrólitos que ajuda a combater a diarreia. Em casos mais graves, pode ser necessário usar antibióticos para tratar a infecção, hidratar o paciente por via intravenosa e administrar medicamentos para aliviar a dor e a diarreia

(Yang *et al*., 2017).

E. coli está presente na lista do *Centro de Controle e Prevenção de Doenças* (CDC) de agentes biológicos potencialmente ameaçadores à saúde pública e a segurança, alem de ter a possibilidade de ser utilizada como arma biológica (CDC, 2018). Vários microrganismos podem ser usados como armas biológicas para guerra e bioterrorismo. O CDC classifica os agentes potenciais como arma biológica em três categorias. Na Categoria A estão os agentes que podem ser facilmente disseminados ou transmitidos de pessoa para pessoa, resultando em alta taxa de mortalidade e impacto na saúde pública. A Categoria B contém patógenos que se espalham com moderada facilidade, causando doenças moderadas e poucas mortes. A Categoria C contém patógenos emergentes com alta morbidade e mortalidade e que podem ser projetados para disseminação em massa e nessa categoria se encaixa a *E. coli* produtora de Shigatoxina (STEC) (Anderson *et al*., 2012).

Em 2021, foi relatado um surto de *E. coli* STEC do tipo O103, após sequenciamento completo do genoma em isolados casos confirmados. Todos esses casos confirmados foram de pacientes internados em dois hospitais localizados em Victoria na Colúmbia Britânica (Canadá), que ingeriram aipo cru picado em sanduíches fornecidos pelos serviços de alimentação hospitalar. Portanto é importante um maior cuidado na preparação de alimentos crus como lacticínios, vegetais ou pescados (Smith *et al*., 2022).

2.2 IMPORTÂNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR *Escherichia Coli* EM ANIMAIS PRODUTORES DE ALIMENTOS

Algumas cepas de *E. coli* podem causar doenças que afetam tanto hospedeiros humanos quanto animais. Essas cepas são denominadas de *E. coli* patogênicas e podem ser classificadas em diferentes grupos com base em seus fatores de virulência e características genéticas. Uma das principais fontes de contaminação por *E. coli* em animais é o ambiente, especialmente a água, a ração e o solo com que eles entram em contato. *E. coli* pode persistir no ambiente por longos períodos e pode ser transmitida entre animais ou de animais para humanos por meio de contato direto ou indireto. Portanto, a contaminação por *E. coli* em animais representa um risco potencial para a saúde pública e o bem-estar animal (Jang *et al*., 2017).

A importância clínica da contaminação por *E. coli* em animais depende de

vários fatores, como a espécie hospedeira, o tipo de cepa, o estado imunológico e o nível de exposição do animal. Algumas cepas de *E. coli* são mais propensas a causar doença em certas espécies animais do que outras, e algumas espécies de animais são mais suscetíveis à infecção do que outras. Por exemplo, a *E. coli* patogênica aviária (APEC) pode causar infecções respiratórias e sistêmicas em aves, mas raramente estão associadas à doença humana (García *et al*., 2021).

A identificação de sorotipos de *E. coli* em animais pode ser difícil devido à diversidade dessa espécie. Métodos moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento de genoma inteiro, podem fornecer informações mais precisas e detalhadas do que os métodos convencionais sobre o grupo filogenético, o perfil de virulência e de resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli*. No entanto, esses métodos não estão amplamente disponíveis ou padronizados para uso rotineiro no diagnóstico veterinário (Karakaya *et al*., 2023; Lagerstrom *et al*., 2021).

O controle da contaminação por *E. coli* em animais requer uma abordagem multidisciplinar e integrada que envolve práticas de manejo animal, gestão ambiental, vacinação e modificação da dieta. Essas estratégias visam reduzir a colonização, persistência e transmissão de cepas patogênicas de *E. coli* em animais e seu ambiente, e assim proteger a saúde animal e humana (Arbab *et al*., 2022).

2.3 QUEIJOS ARTESANAIS E OS PROBLEMAS DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

Queijos artesanais são produtos frequentemente fabricados a partir de leite cru, podendo apresentar uma alta diversidade de características sensoriais e microbiológicas. No entanto, esses queijos também podem representar um risco para a saúde dos consumidores devido à presença de patógenos transmitidos por alimentos que podem contaminar o leite cru ou o queijo durante o processo de produção (Kamimura *et al*., 2019).

Uma das principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru é o próprio animal de ordenha, que pode estar infectado por patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli*, *Brucella* spp. e *Campylobacter* spp. Outra importante fonte de contaminação é o ambiente (silagem[1], cama) contaminado com fezes dos animais. Esses patógenos

[1] Silagem: Forragem que se tira dos silos para alimentar os animais.

podem ser transmitidos para o leite durante a lactação ou principalmente devido a práticas higiênicas inadequadas no processo de ordenha (Baranceli *et al*., 2021).

A qualidade microbiológica e a segurança dos queijos artesanais dependem de vários fatores, como o tipo de queijo, a região de produção, o tempo de maturação, o uso de culturas iniciadoras e as práticas higiênicas ao longo da cadeia produtiva. Alguns estudos têm mostrado que queijos artesanais produzidos em diferentes regiões do Brasil não atendem aos critérios microbiológicos estabelecidos pelas leis nacionais, principalmente devido aos altos índices de *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, patógenos como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* foram isolados em alguns queijos artesanais (Pineda *et al*., 2021).

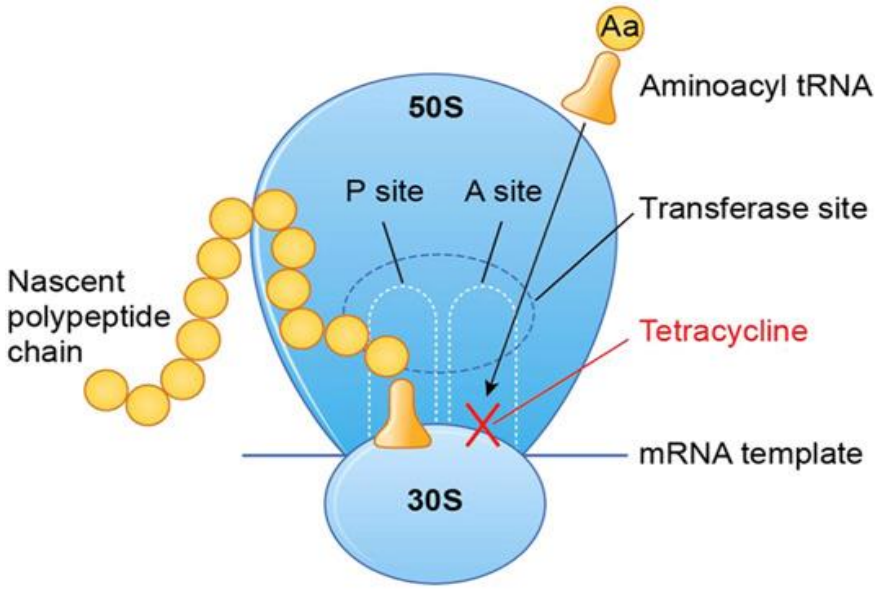
Uma das estratégias para controlar patógenos em queijos artesanais é o uso de agentes biológicos benéficos nos queijos, como bacteriocinas, bacteriófagos ou probióticos. Esses agentes podem inibir ou matar patógenos por diferentes mecanismos, como a interrupção de sua membrana celular, a interferência em seu metabolismo ou a competição por nutrientes e locais de adesão. No entanto, a eficácia desses agentes depende de vários fatores, como sua concentração, estabilidade, especificidade e compatibilidade com a matriz do queijo (Rangel-Ortega *et al*., 2023).

2.4 *Escherichia coli* E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS TETRACICLINAS

O problema de saúde global da resistência antimicrobiana é grave e está aumentando. Muitas bactérias desenvolveram e passaram adiante a capacidade de resistir a diversos antimicrobianos. Esse problema foi agravado pelo uso excessivo e incorreto desses medicamentos. Além disso, o movimento constante de pessoas entre países contribui para a propagação de bactérias resistentes a medicamentos, incluindo as cepas patogênicas de *E. coli* que constantemente estão envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos (Van Der Bij *et al*., 2012).

As tetraciclinas são um grupo de antimicrobianos que inibem a síntese proteica bacteriana ao se ligarem à subunidade 30S do ribossomo, impedindo assim a formação das ligações entre os aminoácidos (Figura 1). Atualmente muitas cepas de *E. coli* adquiriram resistência às tetraciclinas por produzirem proteínas de efluxo que bombeiam essas drogas para fora da célula, tornando-as ineficazes (Bhattacharjee *et al*., 2022).

Figura 1 - Esquema do mecanismo de ação das tetraciclinas.



Fonte: Graber *et al*., 2021.
Legenda: Ação da tetraciclina inibindo aa (aminoácidos) de produzir uma nova cadeia polipeptídica.

As proteínas de efluxo de tetraciclina são codificadas pelos genes *tet*, que são divididos em classes e famílias. Em *E. coli* os genes envolvidos na aquisição de resistência às tetraciclinas são principalmente *tetA* e *tetB*. Esses genes são frequentemente encontrados em plasmídeos e estão associados a elementos genéticos móveis (EGM), como transposons, integrons e pilis sexuais (Galvão *et al*., 2021).

A resistência das cepas de *E. coli* frente aos antimicrobianos pode ocorrer por diferentes vias, como a transferência horizontal de genes (THG), a mutação e a seleção. A THG é o principal mecanismo de aquisição de genes de resistência de outras bactérias, por meio dos EGM. Os EGM podem facilitar a disseminação de genes de resistência entre diferentes cepas de *E. coli* e outras espécies bacterianas (Foudraine *et al*., 2021).

Essa resistência também está relacionada com a mutação e a seleção. A mutação é uma mudança acidental no DNA que pode alterar como um gene é expresso. Por exemplo, uma mutação no promotor de um gene que codifica uma proteína de efluxo pode fazer com que ele seja mais expresso e dessa maneira aumentar a resistência às tetraciclinas. A mutação também pode mudar a forma ou a atividade das proteínas ribossomais, que são as enzimas alvo das tetraciclinas. Já a seleção é o mecanismo pelo qual as bactérias com características favoráveis se

multiplicam e se adaptam em um ambiente específico. Por exemplo, a exposição a concentrações baixas de tetraciclinas pode selecionar cepas de *E. coli* que possuem genes de resistência ou até mesmo proteínas ribossomais mutadas (Hoeksema *et al*., 2019).

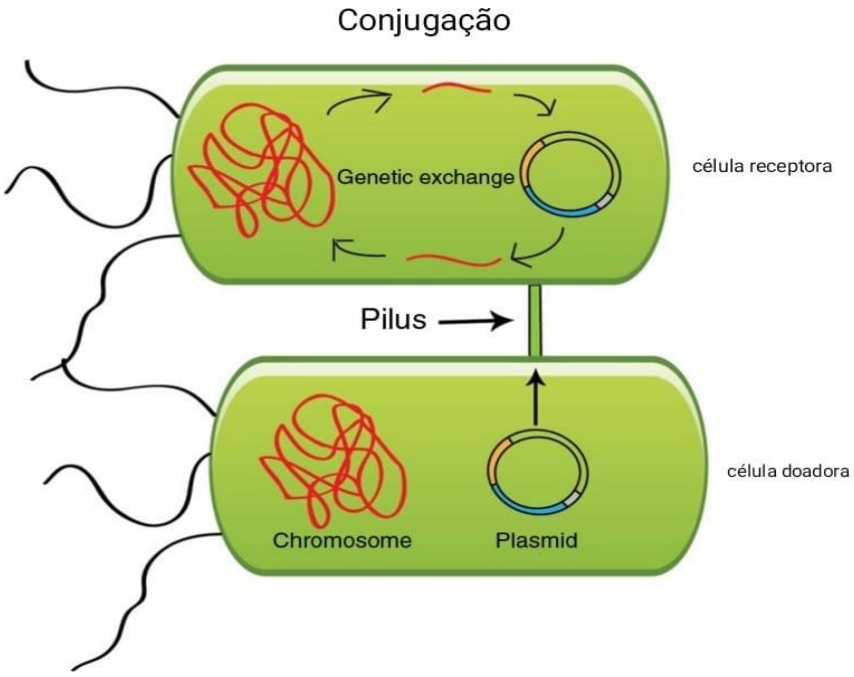
2.5 GENES DE RESISTÊNCIA ÀS TETRACICLINAS EM CEPAS DE *Escherichia coli*

As proteínas de efluxo de tetraciclina são enzimas que podem bombear uma ampla gama de antimicrobianos tetracíclicos, incluindo tetraciclina, doxiciclina e minociclina. Entre os genes codificadores de proteínas de efluxo, *tetA* e *tetB* são os mais comuns, sendo identificados em microrganismos gram-negativos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento para a caracterização molecular desses genes (Beheshti *et al*., 2020).

Os genes de resistência *tetA* e *tetB,* estão localizados em plasmídeos, que são moléculas circulares de DNA capazes de se replicar de forma independente do cromossomo bacteriano. Esses genes são transferidos de maneira horizontal, ou seja, de uma célula bacteriana para outra que não seja sua descendente, utilizando os mecanismos de conjugação. Esse processo (Figura 2) envolve a formação de um tubo de conexão entre as células doadoras e receptoras, por meio do qual os plasmídeos, podem ser transferidos (Pavelquesi *et al*., 2021).

A presença desses genes em cepas de *E. coli* isoladas de queijo artesanal indicam que essas bactérias receberam plasmídeos de outras bactérias presentes na cadeia produtiva do queijo, como as bactérias do leite cru, do fermento endógeno (pingo) ou do ambiente (Costa *et al*., 2013).

Figura 2 - Mecanismo de conjugação bacteriana, por maneira horizontal.



Fonte: Brolund *et al*., 2014

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral detectar os genes de resistência *tetA e tetB* em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Executar a extração de DNA bacteriano para as análises moleculares;
- Realizar a técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR) para confirmação dos genes *lacZB e uidA* nas cepas de *E. coli;*
- Realizar a técnica de PCR para detecção dos genes resistência *tetA e tetB* nas cepas de *E. coli*.

4 JUSTIFICATIVA

O uso excessivo e inadequado dos antimicrobianos da classe das tetraciclinas tem causado o aumento da resistência bacteriana, sendo que as bactérias desenvolvem mecanismos para expulsar ou impedir a ação das tetraciclinas. O surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos é uma grande preocupação em saúde pública, pois limita as opções de tratamento e pode levar a infecções graves e potencialmente fatais.

Portanto, é importante monitorar a resistência bacteriana às tetraciclinas, pois a presença de cepas de *E. coli* portando genes de resistência em alimentos de origem animal representa uma preocupação de saúde pública, uma vez que essa resistência pode ser transmitida aos seres humanos através da cadeia alimentar.

5 MÉTODOS

5.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram analisadas 104 cepas de *Escherichia coli*, que foram isoladas a partir de 22 amostras de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal, coletados em feiras permanentes do Distrito Federal no período de fevereiro de 2019 a novembro de 2020.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano, fez-se o preparo das amostras, que consistiu em cultivar por 16-24 horas as colônias das bactérias isoladas em caldo LB. A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit Purelink Genomic DNA® Mini Kit Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific (Lote n° 1888413 - Catálogo n° K1820-01), seguindo o protocolo do fabricante para extração de bactérias Gram-negativas.

Após o processo de extração, a qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas pela quantificação no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh,USA). Os produtos foram diluídos com água MiliQ® para concentração média de 20 ng/µL e seguiram para a eletroforese em gel de agarose.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

O gene *uidA*, que codifica a enzima β-glucuronidase, e o gene *lacZB*, que codifica a enzima β-galactosidase, são marcadores característicos da espécie *Escherichia coli*. Esses genes podem ser utilizados para confirmar a identidade de cepas de *E. coli* isoladas de diferentes fontes (Molina *et al*., 2015). Para confirmação de resistência a tetraciclina, foram utilizados os genes *tetA e tetB*, que codificam proteínas que atuam como bombas de efluxo, ou seja, expulsam tetraciclinas de dentro da célula bacteriana (Belaynehe *et al*., 2019; Ahmed *et al*., 2010). As análises moleculares foram realizadas por meio da técnica de PCR, que ao amplificar várias cópias da região genômica selecionada, possibilitou a visualização do material

genético analisado (Anvisa, 2019). As sequências de oligonucleotídeos estão descritas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados para identificação dos genes *lacZB*,*uidA*, *tetA,* e *tetB.*

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho(pb)	Referência
lacZB	F: ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC R: CACCATGCCGTGGGITICAATATT	876	(Molina *et al*., 2015)
uidA	F:TGGTAATTACCGACGAAAACGGC R: ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	162	(Molina *et al*., 2015)
tetA	F: GGCGGTCTTCTTCATCATGC R: CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	502	(Belaynehe *et al*., 2018)
tetB	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCCAATAACACCG	659	(Ahmed *et al*., 2010)

Fonte: Autoria própria (2023).
Legenda: F: *foward* (5′→3′); R: *reverse* (5′→3′); pb: pares de base.

As condições de termociclagem na PCR para o gene de virulência *uidA* foram de 95˚C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95˚C por 1 min, anelamento a 60˚C por 1 minuto e 72˚C por 1 min para a extensão final. Para os genes de resistência *tetA* e *tetB*, as condições de termociclagem na PCR foram de 94°C por 1 min; 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 60 segundos, 72°C por 8 minutos para extensão final. A amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando os termocicladores Life Express Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b), Swift MiniPro Thermal Cycler modelo SWT-MIP-0-2-1 e Life Touch Thermal Cycler modelo TC~96/G/H(b)B.

Em cada reação, foram usadas quantidades padronizadas dos reagentes para o protocolo de identificação dos genes *tetA* e *tetB*, que puderam ser visualizados no Quadro 2. Todas as reações foram completadas com água ultrapura para um volume final de 25 µL por reação.

QUADRO 2 – Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de reação em cadeia da polimerase.

Reagente	**Concentração final**	***LacZB* (µL)**	***uidA* (µL)**	***tetA* (µL)**	***tetB* (µL)**
Água MiliQ®	q.s.p 25 µL	14,40	13,85	13,35	13,85
Tampão Taq	10x	2,50	2,50	2,50	2,50
$MgCl_2$ (mM)	50 mM	1,25	1,25	0,75	1,25
dNTP (mM)	2,5 mM	2,00	2,00	2,00	2,00
Oligo *F* (µM)	10 pmol/µL	0,50	0,50	1,00	0,50
Oligo *R* (µM)	10 pmol/µL	0,50	0,50	1,00	0,50
Taq DNA pol (U/µL)	5 U/ µL	0,40	0,40	0,40	0,40
DNA molde	2,4 ng	0,80	0,80	0,80	0,80

Fonte: Autoria própria (2023).
Legenda: q.s.p: quantidade suficiente para; $MgCl_2$: Cloreto de magnésio; mM: milimolar; µM: micromolar; U/µL: unidade de massa atômica por microlitro; ng: Nanograma; µL: microlitro.

6 RESULTADO E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das análises do perfil de suscetibilidade antimicrobiana à tetraciclina das 104 cepas de *E. coli* isoladas a partir das 22 amostras queijos artesanais analisados nesse estudo. Assim, 37,50% (39/104) das cepas mostraram algum tipo de resistência às tetraciclinas e 19,27% (19/104) das cepas foram classificadas como multirresistentes, isto é, resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes.

Tabela 1 - Perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana à tetraciclina das cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijos tipo Minas Frescal de produção artesanal.

Antimicrobiano	**Sensível n (%)**	**Intermediário n (%)**	**Resistente n (%)**
Tetraciclinas	65 (62,50%)	5 (4,81%)	34 (32,69%)
Perfil resistente*		39 (37,50%)	
Perfil Multirresistente†			19 (18,27%)
Total de cepas		104	

Fonte: autoria própria, 2023.
Legenda: n: número de cepas;(%): percentagem em relação ao total de 104 cepas; *Soma dos resultados intermediários mais resistente; †Resistente a dois ou mais antibióticos, incluindo a tetraciclina.

Na literatura existem diversos trabalhos que estudaram a resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* provindas de leite cru e derivados de leite. Thonda e colaboradores (2015) realizaram um estudo com 44 cepas de *E. coli* isoladas iogurte e queijo derivados de leite cru, e encontraram uma taxa de resistência antimicrobiana para tetraciclinas de 56,8% (25/44), sendo que 51,4% (23/44) das cepas eram multirresistentes. Ombarak e colaboradores (2018) analisaram 222 cepas de *E.coli* derivadas de leite cru e queijo Karish, e encontraram 27,5% (61/222) de resistência às tetraciclinas e 14,86% (33/222) das cepas eram multirresistentes. Ambos os resultados foram parecidos ao da nossa pesquisa. No entanto, Messele e colaboradores (2019) reportaram níveis de resistência mais elevados às tetraciclinas de 86,5%(14/16) em 16 isolados de *E. coli* derivados de leite cru, e a multirresistência foi de 68,7%(11/16).

O uso excessivo de tetraciclina para o tratamento de doenças bovinas é uma razão para a alta taxa de resistência bacteriana a essa droga (Jahantigh *et al.,* 2020). Hsu e colaboradores (2015) afirmaram que uma das causas para o aumento da

resistência bacteriana está associada ao uso excessivo de antimicrobianos na medicina veterinária.

A Tabela 2 apresenta os perfis de resistência e multirresistência dos isolados de *E. coli* em amostras de queijo artesanal do tipo Minas Frescal.

Tabela 2 - Perfis de resistência e multirresistência antimicrobiana dos isolados de *Escherichia coli* em amostras de queijo artesanal do tipo Minas Frescal.

Perfil	Antimicrobiano	Nº de cepas
1	SUL -- TET	8 (8,70%)
2	SUL -- TET -- CIP	6(6,52%)
3	SUL -- TET -- AMC	2(2,17%)
4	SUL -- CLO -- TET -- CIP	1(1,09%)
5	SUL -- TET – AMC -- CIP	2(2,17%)
6	SUL -- TET -- GEN -- CIP	1(1,09%)
7	SUL -- CTX -- TET -- AMC	2(2,17%)
8	SUL -- CLO -- TET -- AMC	1(1,09%)
9	SUL -- CLO -- CTX -- TET -- CIP	1(1,09%)
10	SUL -- CLO --TET -- IPM -- CAZ	2(2,17%)
11	SUL -- CTX --TET -- AMC -- CIP	1(1,09%)
12	SUL -- CTX -- TET -- GEN -- CAZ	1(1,09%)
13	SUL -- TET -- GEN -- AMC -- CIP	1(1,09%)
14	SUL -- CTX -- TET -- AMC -- CIP -- CAZ	1(1,09%)
15	SUL -- CTX -- TET -- GEN – AMC – CIP	1(1,09%)

Fonte: autoria própria (2023).
Legenda: AMC: amoxicilina e ácido clavulânico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina.

As cepas de *E. coli* nesse estudo apresentaram resistência a vários tipos de antimicrobianos, incluindo os que pertencem às classes dos beta-lactâmicos, das sulfonamidas e das tetraciclinas. Foram identificados 15 padrões diferentes de multirresistência antimicrobiana.

Um aspecto interessante que se observou foi que, na presença de tetraciclinas, todos os perfis também apresentaram resistência a sulfonamida. Silva e colaboradores (2020) relataram que todas as bactérias Gram-negativas isoladas de

amostras de queijo eram resistentes à sulfametoxazol-trimetoprima[2], e 93,3% delas também eram resistentes à tetraciclina.

A alta resistência às tetraciclinas e sulfonamidas está relacionada ao uso frequente em animais leiteiros. Segundo a FDA (2021), as tetraciclinas foram os antimicrobianos de importância médica mais comercializados e distribuídos para uso em animais produtores de alimentos em 2021, com 65% do total. Assim, mais de 3.916,864 kg de tetraciclinas foram vendidos em 2021, sendo 43% desse total destinado para uso veterinário. As sulfonamidas ocuparam o terceiro lugar, com 9% das vendas para uso veterinário (FDA, 2021).

Neste estudo, foi possível verificar que dois perfis eram resistentes a mais de cinco classes de antimicrobianos. Souto e colaboradores (2017) estudaram a multirresistência em cepas de *E. coli* isoladas de bezerros e porcos em uma fazenda em Minas Gerais e identificaram um perfil em que a *E. coli* era resistente a nove classes de antimicrobianos, incluindo amicacina, cefoxitina, norfloxacina, gentamicina, ácido nalidíxico, amoxicilina, ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima.

Cepas multirresistentes representam uma séria ameaça à saúde pública e sua presença é preocupante, pois podem dificultar e encarecer o tratamento de infecções bacterianas. Gunjan e colaboradores (2023) enfatizaram essa questão e destacaram a necessidade de combater a multirresistência bacteriana. Tiseo e colaboradores (2020) exploraram os desafios para desenvolver novos agentes antimicrobianos, como produtos naturais, peptídeos, bacteriófagos e nanopartículas. Eles indicaram que esses agentes precisam de mais pesquisa, desenvolvimento e aplicação para minimizar os impactos negativos da resistência aos antibióticos nas fazendas de animais produtores de alimentos

No quadro 3, apresentam-se os resultados da caracterização fenotípica e genotípica das cepas de *E. coli* isoladas de 22 amostras de queijos Minas Frescal artesanais analisadas neste estudo. Nas análises dos genes, apenas 92 cepas ativas foram utilizadas, devido à perda de 12 cepas que não cresceram o suficiente para a extração do DNA. Por isso, não foi possível utilizar todas as 104 amostras. Os resultados mostraram que 100% das cepas testadas (n = 92) apresentaram os genes *lacZB* e *uidA* sendo, portanto, confirmadas como *E. coli*.

[2] Antibiótico da classe das sulfonamidas.

Quadro 3 - Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *E.coli* resistentes e multirresistentes à tetraciclina, obtidos de amostras de queijos do tipo Minas Frescal.

Amostra	Cepas de *E.coli*	Deteccção do gene *lacZB**	Detecção do gene *uidA**	Detecção do gene *tetA†*	Detecção do gene *tetB†*	Resultado do Antibiograma	Perfil Multirresistente Fenotípico
A1	1	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	4	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	5	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
	6	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
	7	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
	8	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
	9	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	10	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	11	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
	12	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	13	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	14	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
	15	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	16	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A2	17	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	18	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	19	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	20	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	21	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	22	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	23	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	24	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	25	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	26	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	27	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
	28	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

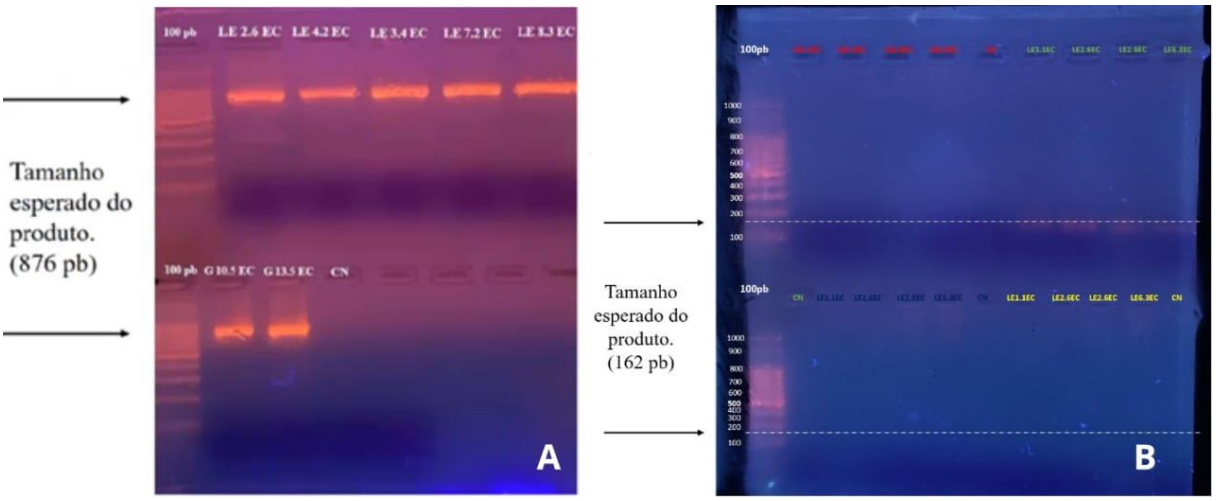
A3	29	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	30	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	31	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	32	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
	33	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	34	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim
	35	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	36	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	37	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	38	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
A4	39	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	40	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	41	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	42	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	43	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	44	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A5	45	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	46	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	47	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
	48	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	49	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	50	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	51	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
A6	52	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	53	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	54	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	55	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
A7	56	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
	57	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
A8	58	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
	59	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
A9	60	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
	61	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	62	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
A10	63	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	64	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	65	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	66	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
A11	67	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

	68	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	69	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A12	70	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	71	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
A13	72	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
A14	73	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	74	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	75	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
A15	76	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
	77	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	78	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
A16	79	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	80	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
	81	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
A17	82	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
A18	83	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
	84	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
A19	85	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
A20	86	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	87	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
A21	88	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	89	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
	90	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
A22	91	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
	92	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não

Fonte: autoria própria, 2023.
Legenda: A1 até A22: Amostras de queijos utilizadas no estudo; * : genes de identificação; † : genes de resistência.

O resultado da padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser visualizado nas imagens A e B da Figura 3.

Figura 3 – Géis das padronizações dos genes *lacZB* e *uidA*.



Fonte: autoria própria, 2023.
Legenda: **A**: Eletroforese em gel de agarose com a detecção do gene *lacZB* em cepas coliformes fermentadoras de lactose. **B**: Gel de agarose à 1,5% com a detecção do gene *uidA* em isolados de *Escherichia coli*. pb: pares de bases; CN: controle negativo.

O gene de identificação *lacZB* é responsável por trazer a informação de que esses isolados são fermentadores de lactose. Essa fermentação é uma característica comum entre as bactérias do grupo dos coliformes, que são usados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos. Por esse motivo o *lacZB* é um marcador confiável e amplamente utilizado para identificar os coliformes (Hammad *et al*., 2022; Molina *et al*., 2015).

Reza e colaboradores (2014), utilizaram 38 cepas isoladas de água potável, das quais 5 foram positivas para o gene *lacZB*. Os autores pontuam que a PCR é a técnica ideal para a análise e identificação de coliformes, visto que todos os 12 controles positivos utilizados em seu estudo apresentaram confirmação genética equivalente. Além disso, Rubio e colaboradores (2019) enfatizaram que utilizar método de cultura para essa identificação pode apresentar algumas restrições como, interações com outros microrganismos, falta de precisão e sensibilidade requerida, além de uma identificação inadequada de bactérias viáveis, mas que não são cultiváveis [3].

Em relação ao gene *uidA*, Alsanjary e colaboradores (2022) utilizaram 400 cepas coletadas de diversos rebanhos leiteiros em Nineveh, Iraque e verificaram que 35% (140/400) das amostras foram positivas para *E.coli* com a identificação do gene

[3] Bactérias que tem uma atividade metabólica muito baixa e não se desenvolvem

uidA. Já Molina e colaboradores (2015) analisaram 24 cepas de leite cru e iogurte e detectaram 52,17% de amostras positivas para o mesmo gene. No estudo de Caine e colaboradores (2014) um total de 197 amostras foram coletadas de leite cru bovino, e 76 amostras (38,57%) foram confirmadas como *E. coli* e apresentaram o gene *uidA.*

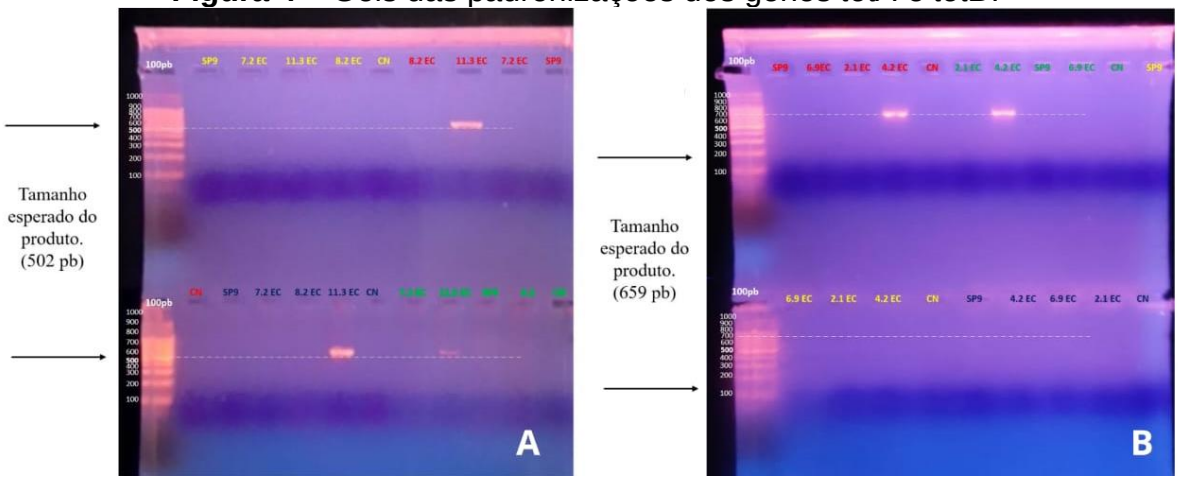
A presença do gene *uidA* é utilizada para a confirmação de *E.coli*, pois ele está presente em mais de 95% das cepas dessa bactéria, mas ausente em outras espécies de *Enterobacteriaceae*. A maioria das outras bactérias do grupo dos coliformes não possui o gene *uidA* ou possui uma versão diferente que não reage com os substratos utilizados nos testes. Portanto, o gene *uidA* é específico para detecção de *E. coli*, o que permite a identificação dessa bactéria (Barbau-Piednoir *et al*., 2018).

Zhang e colaboradores em (1996) empregaram a combinação dos genes *lacZB* e *uidA*, onde o gene *lacZ* foi direcionado para a identificação de bactérias do grupo coliforme e o gene *uidA* teve como objetivo a detecção específica de *E. coli*. Ao analisarem 145 isolados de água do mar para confirmar a presença de *E. coli*, obtiveram um resultado positivo de 79,3% (115/145) das cepas com essa combinação.

Um ponto crucial para ampliar a identificação da *E. coli* é o fato de que essa bactéria possui uma grande importância para a saúde pública, pois tem vários fatores de virulência que podem causar doenças graves e fatais. Além disso, muitas cepas de *E. coli* são resistentes a diversos antimicrobianos, o que dificulta o tratamento efetivo. *E. coli* pode ser transmitida de animais para humanos por meio do contato direto com animais, disseminação indireta no ambiente, e consumo de carne, leite e seus derivados (Sarowska *et al*., 2019).

No que diz respeito aos genes de resistência *tetA* e *tetB*, eles são responsáveis por codificar bombas de efluxo que conferem resistência às tetraciclinas em bactérias Gram-negativas. As imagens A e B da Figura 4 apresentam a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste estudo, foram analisadas 92 cepas de *E. coli*, das quais 63 cepas (68,47%) apresentaram os genes *tet*, sendo 39 cepas (42,39%) com presença dos genes *tetA* e *tetB*, 14 cepas com presença do gene *tetA* (15,22%) e 10 cepas (10,86%) com presença do gene *tetB*.

Figura 4 – Géis das padronizações dos genes *tetA* e *tetB*.



Fonte autoria própria, 2023.
Legenda: **A:** Gel de agarose à 1,5% com a detecção do gene de resistência *tetA* em isolados de *Escherichia coli*. **B:** Gel de agarose à 1,5% com a detecção do gene de resistência *tetB* em isolados de *Escherichia coli*. pb: pares de bases; CN: controle negativo.

Das 92 cepas de *E. coli* estudadas, 48 cepas (52,17%) tiveram perfil sensível a tetraciclina no antibiograma e 44 cepas apresentaram um perfil resistente a tetraciclina no antibiograma (47,82%). Assim, um resultado que merece destaque foi que 33 cepas (35,86%) apresentaram um perfil sensível a tetraciclina no antibiograma e apresentaram algum dos genes *tet* estudados. Outro resultado interessante foi que 10 cepas (10,87%) obtiverem um perfil resistente a tetraciclina no antibiograma e não apresentaram os genes *tetA* ou *tetB*.

Outro ponto interessante é que 32 cepas (34,78%) apresentaram multirresistência (MDR) e dessas 24 cepas (26,08%) foram resistentes a tetraciclina no antibiograma e apresentaram algum dos genes *tet* estudados, 6 cepas (6,52%) foram sensíveis a tetraciclina no antibiograma e apresentaram algum dos genes *tet* estudados, 1 cepa (1,09%) foi resistente a tetraciclina e não apresentou os genes *tet* estudados e 1 cepa (1,09%) foi MDR em relação a outros antimicrobianos estudados.

De acordo com Roberts e colaboradores (2016), um total de 46 diferentes genes foram identificados como genes que conferem resistência as tetraciclinas, e a maioria foi identificada como *tet*. Esses genes *tet* são codificadores de proteínas que estão ligadas a membrana plasmática e trocam um próton por um complexo tetraciclina-cátion contra um gradiente de concentração, diminuído assim a concentração intracelular de tetraciclina, o que por sua vez protege os ribossomos dentro da célula. Os genes *tet* são os mais comumente encontrados em bactérias da família Enterobacteriaceae. O gene *tetB* é específico para bactérias Gram-negativas

aeróbias e facultativas, estando presentes em 33 gêneros. E o gene *tetA* está presente em 23 gêneros de bactérias Gram-negativas.

Skocková e colaboradores (2012) realizaram um estudo em 2006 com 37 cepas de *E. coli* retiradas de leite cru em fazendas na República Tcheca, e verificaram que dentre esses isolados apenas 8,1% (3/37) possuíam o gene de resistência *tetA*. Após refazerem o estudo em 2011, com 16 cepas de *E. coli* retiradas de leite cru das mesmas fazendas, verificaram um total de 81,3% (13/16) de cepas positivas para o gene *tetA*, com um aumento de 73,2% de positividade em apenas cinco anos.

Tabaran e colaboradores (2017) isolaram 13 cepas de *E. coli* resistentes a tetraciclinas de leite cru e queijos tradicionais não pasteurizados na Romênia e detectaram o gene *tetB* em 53,8% (7/13) dos isolados. Esses resultados indicam que os genes *tet* podem variar em sua distribuição de acordo com diferentes populações bacterianas (Sun *et al*., 2019).

No Quadro 3 é possível observar que algumas cepas foram resistentes a tetraciclina no antibiograma, mas não expressaram os genes de resistência *tetA* ou *tetB*. Isso pode ocorrer devido à ausência ou redução da expressão do gene, mesmo que ele esteja presente no DNA da célula bacteriana, ou ainda devido a presença de outros genes de resistência as tetraciclinas que não foram abordados no presente estudo. Segundo Mapipa e colaboradores (2022), fatores ambientais ou genéticos, como inserções, deleções ou mutações, podem afetar a expressão dos genes de resistência[4].

A expressão gênica pode ser regulada em diferentes níveis, como transcrição, processamento, tradução e pós-tradução. A regulação da expressão gênica é essencial para que as células possam responder a diferentes estímulos e condições ambientais, bem como para manter a homeostase e a diferenciação celular (Ali *et al*., 2022).

Observou-se que alguns isolados não apresentaram resistência à tetraciclina no antibiograma, mas apresentaram os genes *tetA* e *tetB* expressos e visualizados pela técnica de PCR. Isso pode indicar que a expressão desses genes é regulada por diferentes fatores que afetam sua transcrição ou tradução. A transcrição é o processo pelo qual o DNA é copiado em uma molécula de RNA mensageiro, levando a informação genética para os ribossomos. A tradução é o processo pelo qual o RNA

[4] A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida em um gene é usada para sintetizar uma proteína ou um RNA.

mensageiro é utilzado para sintetizar uma proteína, da qual confere a resistência à tetraciclina (Nøhr-Meldgaard et al., 2021).

De acordo Møller e colaboradores (2016) a expressão dos genes *tetA* e *tetB* varia dependendo da concentração de tetraciclina e da fase de crescimento das bactérias, resultando assim em diferentes níveis de resistência. Portanto, é possível que os isolados que não apresentaram resistência no antibiograma tenham uma baixa expressão dos genes *tetA* e *tetB*, ou que esses genes não estejam sendo traduzidos em proteínas funcionais.

Estes resultados revelam uma elevada frequência de resistência a este grupo de antibimicrobianos nessas cepas, o que significa que elas possuem uma característica genética que lhes permite sobreviver em ambientes com essas drogas. Assim, essas drogas normalmente matariam ou inibiriam o crescimento das bactérias, mas as bactérias resistentes conseguem escapar ou neutralizar a sua ação (Tavares *et al.*, 2019).

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi avaliada a resistência a tetraciclinas em cepas de *E. coli*, um patógeno que representa um risco para a saúde pública, isoladas de queijos artesanais do tipo Minas Frescal. Observou-se que a maioria das cepas de *E. coli* testadas 68,47% (63/92) apresentaram os genes de resistência as tetraciclinas *tetA* e *tetB* avaliados nesse estudo. Isso desperta a preocupação de que os queijos artesanais possam servir como uma potencial fonte de disseminação desses genes de resistência entre bactérias patogênicas, desse modo comprometendo significativamente a eficácia da terapia com tetraciclina e outros antimicrobianos relacionados, dificultando o tratamento de infecções causadas por estas cepas resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. M., *et al*. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 475-483, 2013.

ALI, M.Z. *et al*. Controlling gene expression timing through gene regulatory architecture. **PLoS Computational Biology**, v. 18, n. 1, p. e1009745, 2022.

ALSANJARY, L. H., *et al*;. Molecular detection of *uidA* gene in *Escherichia coli* isolated from the dairy farms in Nineveh governorate, Iraq. **Iraqi Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 3, p. 599-603, 2022.

ANDERSON, P. D. *et al*. Bioterrorism: pathogens as weapons. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 25, n. 5, p. 521-529, 2012.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, DF. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

ARBAB, S., *et al*. Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 4, p. 1780-1786, 2022.

BARANCELI, G. V. *et al*. Occurrence of *Escherichia coli* and coliforms in minas cheese plants from Sao Paulo, Brazil. **Advances in Dairy Research**, p. 1-4, 2014.

BARBAU-PIEDNOIR, E. *et al*. Detection and discrimination of five *E. coli* pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 3267-3285, 2018.

BASTAM, M. M. *et al.* Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurized milk. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 6, p. 2445-2449, 2021.

BEHESHTI, M. *et a*l. Tetracycline resistance mediated by tet efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

BELAYNEHE, K. M., *et al.* Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* isolates from cattle farms. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2018.

BHATTACHARJEE, M. K. *et al*. **Antibiotics that inhibit protein synthesis.** In: Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 149-177.

BRYAN, A. *et al*. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 247-272, 2015.

BROLUND, A. *et al*. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 24555, 2014.

CAINE, L.A. *et al*. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk from two commercial dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11950-11963, 2014.

DELORME, M. M. *et al*. Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 146-154, 2020.

EMBRAPA. Anuário Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. Brasília: Embrapa, 2019. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1109959. Acesso em: 20 dez. 2023.

GALVÃO, I.C. *et al*. **Resistência bacteriana: uma investigação genômica baseada em mecanismos de resistência contra a azitromicina (2019-2021)**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CDC Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response. Disponível em: https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp. Acesso em: 3 maio 2023.

COSTA, H. H. S. *et al*. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1858-1866, 2013.

FDA. Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. Silver Spring: FDA, 2021. Disponível em: https://www.fda.gov/media/163739/download. Acesso em: 18 nov. 2023.

FOUDRAINE, D. E. *et al*. Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae* using proteogenomics. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12472, 2021.

GARCÍA, A. F. *et al*. A one health perspective for defining and deciphering *Escherichia coli* pathogenic potential in multiple hosts. **Comparative Medicine**, v. 71, n. 1, p. 3-45, 2021.

GUNJAN H. *et al*. Comparative meta-analysis of antimicrobial resistance from different food sources along with one health approach in the Egypt and UK. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 291, 2023.

GRABER, E.M. *et al*. Treating acne with the tetracycline class of antibiotics: A review. **Dermatological Reviews**, v. 2, n. 6, p. 321-330, 2021.

GROSSMAN, T. H. *et al*. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 4, 2016.

HAMMAD, A. M. *et al*. Loads of coliforms and fecal coliforms and characterization of thermotolerant Escherichia coli in fresh raw milk cheese. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 332, 2022.

HOEKSEMA, M*. et al*. Effects of a previously selected antibiotic resistance on mutations acquired during development of a second resistance in *Escherichia coli*. **BMC genomics**, v. 20, p. 1-14, 2019.

HSU, C. Y. *et al*. Antibiotic resistance pattern and gene expression of non-typhoid Salmonella in riversheds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 7843-7850, 2015.

JANG J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JAHANTIGH, M. *et al*. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2020.

KAMIMURA, B. A. *et al*. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019.

KARAKAYA, E. *et a*l. *Escherichia coli* in different animal feces: phylotypes and virulence genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2023.

LAGERSTROM, K. M. *et al*. The under-investigated wild side of *Escherichia coli*: genetic diversity, pathogenicity and antimicrobial resistance in wild animals. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 288, n. 1948, p. 20210399, 2021.

MAPIPA, Q. *et al*. Molecular characterization and antibiotic susceptibility profile of *Acinetobacter baumannii* recovered from hospital wastewater effluents. **Current Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 123, 2022.

MESSELE, Y.E. *et al*. Analysis of milk-derived isolates of *E. coli* indicating drug resistance in central Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p. 661-667, 2019.

MØLLER, T.S. *et al*. Relation between *tetR* and *tetA* expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016.

MOLINA F. *et al*. Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. **BMC Biotechnology**, 2015.

NØHR-MELDGAARD K. *et al*. The tetracycline resistance gene, *tet* (W) in *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis follows phylogeny and differs from *tet* (W) in other species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 658943, 2021.

OMBARAK, R. A. *et a*l. Detection of plasmid mediated colistin resistance mcr-1 gene in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from raw milk hard cheese in Egypt. **International Dairy Journal**, v. 117, p. 104986, 2021.

PAVELQUESI, P*. et al*. Presence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in Salmonella spp.: literature review. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1314, 2021.

PINEDA, A. P. A. *et al*. Brazilian artisanal cheeses: Diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers in Microbiology**, p. 732, 2021.

PROCOP, G. W. *et al*. **Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas.** Jones & Bartlett Learning, 2017. 1830 p.

RANGEL-ORTEGA, S. D. C. *et al*. Biological control of pathogens in artisanal cheeses. **International Dairy Journal**, p. 105612, 2023.

ROBERTS, M. C. *et al*. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n. 2, p. 576-592, 2016.

REZA, Z. M., *et al*. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probably Number). **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. 5, p. 404-409, 2014.

RUBIO, M. S. *et al*. Duplex Real-Time PCR Using Sybr Green I for Quantification and Differential Diagnosis between *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 21, 2019.

SALEH, M. M. *et al*. Bacteriological quality and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from organic and conventional fresh cheese. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023.

SANTOS, E. D. *et al.* Bacterial communities in artisanal raw bovine milk cheeses from the southern region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, n. 9, p. e20220306, 2023.

SAROWSKA, J. *et al*. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v. 11, p. 1-16, 2019.

SKOCKOVÁ, A. *et al.* Detection of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, p. 777, 2012.

SILVA, C. R. *et al*. Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430-440, 2020.

SOUTO, M. S. *et al*. Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 13-23, 2017.

SMITH, C., *et al. Escherichia coli* O103 outbreak associated with minced celery among hospitalized individuals in Victoria, British Columbia, 2021. **Canada Communicable Disease Report**, v. 48, n. 1, p. 46-50, 2022.

SUN, C., *et al*. Plasmid-mediated tigecycline-resistant gene *tet* (X4) in *Escherichia coli* from food-producing animals, China, 2008–2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 1524-1527, 2019.

TABARAN, A. *et al*. First study on characterization of virulence and antibiotic resistance genes in verotoxigenic and enterotoxigenic *E. coli* isolated from raw milk and unpasteurized traditional cheeses in Romania. **Folia Microbiologica**, v. 62, p. 145-150, 2017.

TISEO, K. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 918, 2020.

THONDA, O. A., *et al*. Prevalence of multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* serotypes in cow raw milk samples and traditional dairy products in Osun State, Nigeria. **British Microbiology Research Journal**, v. 5, n. 2, p. 117, 2015.

TAVARES, A. B. *et al.* Artisanal cheese produced in the south of Rio Grande do Sul: physical-chemical, microbiological assessment and susceptibility of antimicrobials from *Staphylococcus* coagulase positive isolates. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.

VAN DER BIJ, A. K. *et al*. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2090-2100, 2012.

WHO WORLD HEALTH ORGANISATION. ***E. coli***. 12 dez. 2018. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli . Acesso em: 20 abr. 2023.

YANG, S. C. *et a*l. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 811-825, 2017.

ZHANG, S. *et al*. Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (uidA) and selected (bar) transgenes in maize (Zea mays L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 752-761, 1996.