UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

NATHALIA MATEUS BORGES

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$ e *bla*-$_{TEM}$ EM CEPAS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE QUEIJOS ARTESANAIS

BRASÍLIA, 2025

NATHALIA MATEUS BORGES

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$ e *bla*-$_{TEM}$ EM CEPAS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE QUEIJOS ARTESANAIS

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof(a). Msc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Co-orientador: Prof(a). Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2025

CIP - Catalogação na Publicação

MB732ii

Mateus Borges, Nathalia .
Identificação dos genes de resistência bla-CTX-M, bla-SHV e bla-TEM em cepas de Escherichia coli provenientes de queijos artesanais / Nathalia Mateus Borges;

Orientador: Letícia Fernandes Silva Rodrigues; co-orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2025.
48 f.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2025.

1. Qualidade microbiológica de alimentos. 2. Laticínios . 3. Biologia molecular. 4. Escherichia coli. 5. Resistência microbiana a medicamentos. I. Fernandes Silva Rodrigues, Letícia, orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

NATHALIA MATEUS BORGES

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$ e *bla*-$_{TEM}$ EM CEPAS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE QUEIJOS ARTESANAIS

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador(a): Prof(a). Msc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCTS – Universidade de Brasília)

_____

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

_____

Msc. Carla Azevedo Bilac
(FCTS – Universidade de Brasília)

_____

Esp. Rebeca Dias dos Santos
(FCTS – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus e Nossa Senhora por me dar força, saúde e determinação durante toda a minha jornada acadêmica.

À minha família, especialmente a minha mãe e meu pai, por sempre me incentivar e fornecer toda a base necessária, vocês são o exemplo que eu sigo. Às minhas irmãs pelos conselhos e suporte quando mais precisava, ao meu namorado por todo o companheirismo e amor, todos sempre com muita paciência e apoio incondicional. Vocês foram cruciais para o sustento da minha caminhada.

À minha orientadora, Letícia, pela prontidão, dedicação, paciência e orientação excepcional durante todas as etapas deste trabalho. Sua experiência e comprometimento foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço também às instituições e profissionais que colaboraram direta ou indiretamente com este estudo, em especial ao grupo de Patologia Molecular, aos Laboratórios de Controle de Qualidade Microbiológico e Laboratório de Análises Clínicas pelo suporte técnico, disponibilização de recursos e acolhimento para a realização da pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de certa forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse. Cada gesto, por menor que pareça, foi fundamental para que pudesse concluir esta etapa da minha vida.

RESUMO

O queijo artesanal produzido a partir do leite não pasteurizado possui uma microbiota diversa, responsável por características especiais. Porém em casos como o queijo Minas Frescal que não passa por processo de maturação, o uso de leite cru favorece o crescimento de microrganismos patogênicos. Outra preocupação crescente com a contaminação de alimentos com microrganismos patogênicos é que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal impulsiona o surgimento de microrganismos resistentes. Assim, este estudo teve como objetivo identificar em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijos do Tipo Minas Frescal artesanal a presença de genes de virulência e de resistência antimicrobiana. Dessa forma, foi feita a análise molecular de DNA bacteriano extraído de 104 cepas de *E. coli* isoladas a partir de 22 amostras de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal, coletados em feiras permanentes do Distrito Federal. A confirmação das cepas de *E. coli* ocorreu por identificação do gene de virulência (*uidA)*, e foram pesquisados os genes de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos *bla-*$_{CTX-M}$*, bla-*$_{SHV}$ e *bla-*$_{TEM}$. Das cepas confirmadas como *E. coli* (81/104) foi encontrada uma prevalência de 60,7% para *bla-*$_{CTX-M}$, 43,0% para *bla-*$_{TEM}$ e 26,5% para *bla-*$_{SHV}$. A alta prevalência de genes de resistência antimicrobiana nas cepas de *E. coli* analisadas, reflete a utilização indiscriminada de antibióticos na produção animal e a transferência horizontal de genes entre bactérias, levando a preocupação de saúde pública quanto a veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos portando genes de resistência antimicrobiana através da cadeia alimentar.

Palavras-chave: higiene alimentar, resistência a antibióticos, laticínios, biologia molecular

ABSTRACT

Artisanal cheese made from unpasteurized milk contains a diverse microbiota, which is responsible for its unique characteristics. However, in cases such as fresh Minas cheese, which does not undergo a maturation process, the use of raw milk promotes the growth of pathogenic microorganisms. Another growing concern regarding food contamination with pathogenic microorganisms is that the indiscriminate use of antibiotics in animal production drives the emergence of resistant microorganisms. This study aimed to identify the presence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from artisanal fresh Minas cheese. Molecular analysis was conducted on bacterial DNA extracted from 104 *E. coli* strains isolated from 22 samples of artisanal Minas cheese collected from permanent markets in the Federal District. The *E. coli* strains were confirmed through the identification of the virulence gene (*uidA*), and β-lactam resistance genes (*bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$, and *bla*-$_{TEM}$) were analyzed. Among the confirmed *E. coli* strains (81/104), a prevalence of 60.7% for *bla*-$_{CTX-M}$, 43.0% for *bla*-$_{TEM}$, and 26.5% for *bla*-$_{SHV}$ was observed. The high prevalence of antimicrobial resistance genes in the analyzed *E. coli* strains reflects the indiscriminate use of antibiotics in animal production and the horizontal gene transfer between bacteria. This poses a public health concern regarding the dissemination of potentially pathogenic microorganisms carrying antimicrobial resistance genes through the food chain.

Keywords: food hygiene, antibiotic resistance, dairy products, molecular biology

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de oligonucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados para identificação dos genes *bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$, *bla*-$_{TEM}$ e *uid*A 28

Quadro 2 - Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase 29

Quadro 3 - Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana à amoxicilina e ácido clavulânico, cefotaxima, ceftadizima e imipenem de cepas de *E. coli* isoladas de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal 30

Tabela 2 - Perfis de multirresistência antimicrobiana de cepas de *E. coli,* com a presença de pelo menos um antibiótico do grupo dos β-lactâmicos, isoladas a partir de amostras de queijo artesanal do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Série histórica de surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil entre os anos de 2014 e 2023 15

Figura 2 - Perfil epidemiológico das Doenças Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil entre 2014 e 2023: Frequência da Distribuição dos alimentos causadores de surtos e dos agentes etiológicos 17

Figura 3 - Representações da morfologia da *Escherichia coli* 18

Figura 4 - Esquemas de virulência da *Escherichia coli* 19

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação dos antimicrobianos β-lactâmicos 22

Figura 6 - Gel de agarose a 1,5% dos genes *uidA, bla-$_{CTX-M}$, bla-$_{SHV}$* e *bla-$_{TEM}$* 37

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitros
AMC	Amoxicilina e ácido clavulânico
BPA	Boas Práticas de Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAZ	Ceftadizima
CIP	Ciprofloxacino
CLO	Cloranfenicol
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
EAEC	*Escherichia coli* Enteroagregativa
EIEC	*Escherichia coli* Enteroinvasiva
EPEC	*Escherichia coli* Enteropatogênica
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
ETEC	*Escherichia coli* Enterotoxigênica
E. coli	*Escherichia coli*
DAEC	*Escherichia coli* de Aderência Difusa
GEN	Gentamicina
MDR	Microrganismos multirresistentes
ng	Nanogramas
IPM	Imipenem
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
STEC	*Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga
STX	Toxina Shiga
SUL	Sulfonamida
TET	Tetraciclina
THG	Transferência Horizontal de Genes
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REVISÃO DE LITERATURA 13

2.1 QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL 13

2.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E AS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DTHA) 14

2.3 VIRULÊNCIA DA *ESCHERICHIA COLI* 18

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS β-LACTÂMICOS 21

3 OBJETIVO 24

3.1 OBJETIVO GERAL 24

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

4 JUSTIFICATIVA 25

5 MÉTODOS 26

5.1 COLETA DE AMOSTRAS E ANTIBIOGRAMA 26

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES 26

5.3 ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO 26

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 30

7 CONCLUSÃO 39

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a legislação brasileira “o leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (Brasil, 2017a). A partir do leite podem ser fabricados diversos produtos lácteos como, por exemplo, o queijo do tipo Minas Frescal, que segundo a legislação brasileira é definido como:

> queijo fresco, de alta umidade, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, podendo ser complementado com bactérias lácticas específicas (Brasil, 1997).

Os dados do censo agropecuário realizado em 2017 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostraram que dos 175 mil produtores brasileiros de queijos, cerca de 140 mil são agricultores familiares (IBGE, 2018). A produção artesanal de queijos em pequenas propriedades pode trazer desvantagens como, a falta de padronização na produção e a dificuldade em seguir um controle rígido de qualidade (Kamimura *et al*., 2019).

A fabricação de queijos a partir de leite cru não processado abriga uma microbiota rica que confere sabores e aromas especiais, mas é responsável também pelo crescimento de microrganismos patogênicos em queijos não maturados, sendo uma prática proibida pelos órgãos de fiscalização sanitária para a produção de queijos frescos (Boor *et al.*, 2017; Rocha *et al.,* 2023). Os principais microrganismos patogênicos que podem contaminar os produtos derivados do leite cru são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, que são causadores frequentes de surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) (Saleh *et al.,* 2023)

A bactéria *E. coli* faz parte da microbiota comensal do intestino de diferentes espécies de animais, incluindo seres humanos e bovinos. A presença dessas bactérias em água e alimentos funciona como um indicativo de contaminação fecal (Molina *et al.*, 2015). Apesar de grande parte das cepas de *E. coli* não serem patogênicas, algumas possuem sorotipos patogênicos capazes de causar várias doenças em seres humanos (Chavez-Martinez *et al*., 2019).

Um grave problema enfrentado pela saúde pública é o surgimento crescente de cepas de *E. coli* com resistência antimicrobiana, e a utilização indiscriminada de antibióticos na produção animal contribui significativamente para esse aumento, dificultando o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (Ullah *et al*., 2024). Os tipos de mecanismos de resistência apresentados pelas bactérias, podem envolver alterações genéticas que levem a produção de enzimas que modificam a ação dos antibióticos, assim como, fatores que afetam a permeabilidade da membrana (Lima; Benjamin; Dos Santos, 2017).

Um tipo de resistência adquirida por cepas de *E. coli* que vem se tornando cada vez mais comum é a produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL). As principais β-lactamases envolvidas na resistência antimicrobiana são as enzimas SHV, TEM e CTX-M que são codificadas pelos genes *bla*-$_{SHV}$, *bla*-$_{TEM}$ e *bla*-$_{CTX}$, respectivamente. A presença dessas enzimas torna tais bactérias resistentes a penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, fazendo com que haja um aumento da mortalidade, morbidade, custo da hospitalização e atraso na terapia apropriada (Gundran *et al*., 2019).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL

O queijo é um alimento de alto valor nutritivo, constituído por proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, sendo considerado parte de uma alimentação saudável (De Castro, 2023). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, o Brasil possui um consumo per capta de queijo de cerca de 5,6 kg/ano e está entre os cinco maiores produtores de leite do mundo (ABIQ, 2021). O Brasil produz diversos tipos de queijos, sendo o queijo Minas Frescal e suas variações os mais consumidos (Newsletter, 2023).

A produção dos queijos pode ocorrer de maneira industrial ou artesanal. Para os queijos industriais há regulamentações específicas para a produção em larga escala, incluindo a padronização dos ingredientes e processos automatizados, enquanto para a produção do queijo artesanal há maior flexibilidade quanto aos ingredientes utilizados e métodos de processo. Para ambos os produtos, deve ser realizado o controle de qualidade, sendo que, os queijos industriais geralmente têm fiscalização mais rigorosa devido à produção em grande escala (Araújo *et al.*, 2020).

O queijo artesanal brasileiro é um alimento amplamente consumido no país e a legislação brasileira (Brasil, 2019a) o define como um produto elaborado a partir de métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, seguindo o protocolo específico de elaboração e respeitando sempre as boas práticas agropecuárias e de fabricação. O seguimento de tais parâmetros pode conferir ao estabelecimento produtor a certificação de Selo Queijo Artesanal e Selo Arte assegurando que produto possui propriedades únicas adquiridas pelo método de produção artesanal.

Os padrões mínimos exigidos para as boas práticas agropecuárias (BPA) e de fabricação (BPF) são apresentados na Instrução Normativa nº 73 de 2019 (Brasil, 2019b) e no Decreto nº 9.013 de 2017 (Brasil, 2017a). O regulamento técnico de BPA e os manuais de BPF dão ênfase aos aspectos sanitários dos rebanhos produtores do leite usado na produção de queijo artesanal, abordando questões como o bem-estar dos animais, a saúde e higiene dos colaboradores, a sustentabilidade ambiental e a sistematização dos procedimentos operacionais higiênicos-sanitários, com o intuito de

garantir a qualidade e integridade do produto de origem animal. O controle de brucelose e tuberculose são exemplos das medidas exigidas às propriedades fornecedoras de leite (Brasil, 2017b). Assim, o leite utilizado na produção de queijo artesanal deve ser proveniente de vacas sadias, em bom estado de nutrição e que não estejam no final de gestação ou na fase colostral, com a garantia de inocuidade, identidade e qualidade (Brasil, 2019b).

O queijo do tipo Minas Frescal é classificado como um queijo semi-gordo (contém entre 25,0 e 44,9% de lipídios no extrato seco[1]) e de muita alta umidade (acima de 55%). De acordo com a legislação brasileira, na sua produção deve ser utilizado o leite submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente que garanta a inocuidade do produto (Brasil, 1997; Brasil, 1996). Por se tratar de um queijo fresco, existem parâmetros que devem ser seguidos em sua produção e armazenamento, como manipulação adequada e temperatura correta de refrigeração (Brasil, 1997; Brasil, 1996).

Apesar das exigências para fabricação, armazenamento e comercialização, é grande o comércio de queijos artesanais que não seguem com rigor as legislações, favorecendo o crescimento de microrganismos patogênicos, comprometendo a qualidade do produto e impactando diretamente na saúde do consumidor (Ferrocino, Rantsiou, Cocolin, 2021).

2.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E AS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DTHA)

A produção e comercialização de alimentos acontece em diferentes escalas, desde a microprodução até as grandes escalas industriais. As más condições de higiene, armazenamento e o não seguimento das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) favorecem o crescimento de microrganismos patogênicos nos alimentos, podendo ocasionar surtos de Doenças de Transmissão Hídrica Alimentar (DTHA) (Oliveira *et al.*, 2021).

[1] Representa todos os componentes sólidos do leite presentes no queijo, como proteínas, gorduras, minerais e outros nutrientes, excluindo a água.

As DTHA são aquelas doenças causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, sendo esses episódios considerados surtos quando duas ou mais pessoas apresentam doença ou sintomas semelhantes após essa ingestão. Os sinais e sintomas mais comuns das DTHA são náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, falta de apetite e febre (Brasil, 2024).

Os surtos das DTHA constituem Eventos de Saúde Pública[2] representando uma ameaça a saúde da população, devendo ser notificado de forma compulsória. Na Figura 1 é apresentado o perfil epidemiológico com a série histórica dos surtos de DTHA de acordo com o Ministério da Saúde durante o período de 2014 à 2023. Os dados mostram uma diminuição nos casos de hospitalizações e óbitos no ano de 2020, podendo indicar a relação das medidas de higienização de alimentos, superfície e mãos que foi adotada com a pandemia de COVID-19, com a diminuição dos casos, o contrário podemos observar no ano de 2023 com um grande aumento no número de hospitalizados e óbitos (Brasil, 2024).

Figura 1 - Série histórica de surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil entre os anos de 2014 e 2023

Ano	Nº de surtos	Nº de expostos	Nº de doentes	Nº de hospitalizado	Nº de óbitos	Letalidade
2014	886	124359	15700	2524	9	0,06
2015	673	37165	10676	1453	17	0,16
2016	538	200896	9935	1406	7	0,07
2017	598	47409	9426	1439	12	0,13
2018	597	57297	8406	916	9	0,11
2019	771	17388	9586	1301	10	0,10
2020	292	10548	4600	595	6	0,13
2021	546	17076	8278	639	10	0,12
2022	811	33977	14336	630	10	0,07
2023	1162	27854	19671	1443	31	0,16
Total	**6874**	**573969**	**110614**	**12346**	**121**	**0,11**

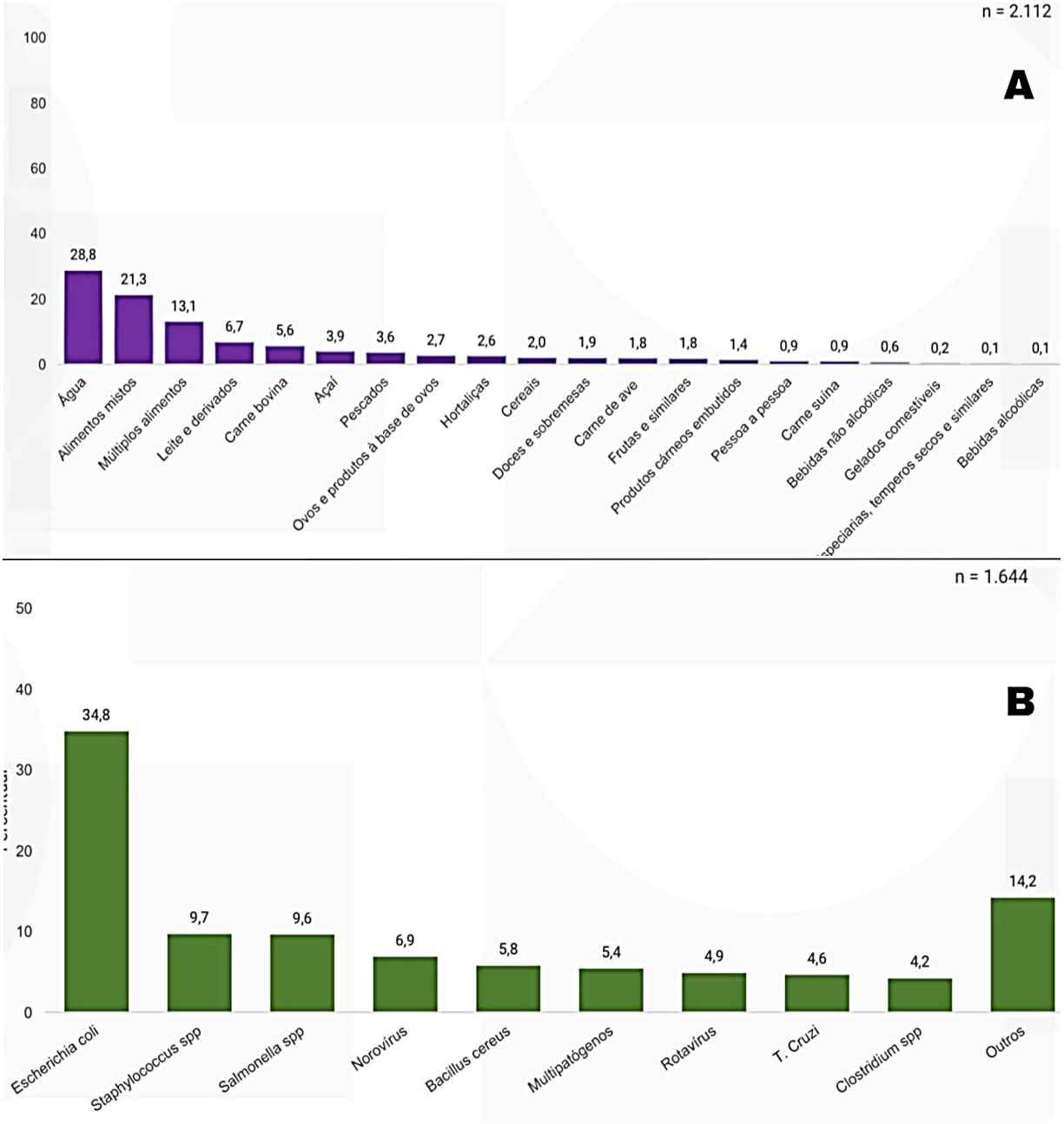
Fonte: Sinan/SVSA/Ministério da Saúde (2024).

[2] Potencial ameaça à saúde pública, como a ocorrência de surto ou epidemia, doença ou agravo de causa desconhecida, alteração no padrão clínico epidemiológico das doenças conhecidas, epizootias ou agravos.

A contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer etapa do processo de produção e a ingestão desses alimentos contaminados representa um problema crescente de saúde pública. Os agentes etiológicos capazes de desencadear uma DTHA são as bactérias, as toxinas, os vírus, substâncias químicas e parasitas intestinais. Os principais microrganismos apontados nos surtos são *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Bacillus cereus, Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinium* (Beshearse *et al.,* 2021; OMS, 2023). Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde, que estão representados na Figura 2, é possível notar que a bactéria *E. coli* é a mais frequente nos surtos, além das fontes de contaminação mais comuns serem a água e alimentos mistos[3] (Brasil, 2024).

[3] Alimentos que em sua preparação são usados alimentos de origens diferentes.

Figura 2 - Perfil epidemiológico das Doenças Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil entre 2014 e 2023: Frequência da Distribuição dos alimentos causadores de surtos e dos agentes etiológicos



Fonte: Sinan/SVSA/Ministério da Saúde (2024).

Legenda: Perfil epidemiológico das Doenças Transmissão Hídrica e Alimentar. A: Frequência da Distribuição dos alimentos causadores de surtos de DTHA no Brasil entre 2014 e 2023; excluídos registros ignorados[4], inconsistente[5] e inconclusivos[6] (n = 4.762). B: Frequência da Distribuição dos

[4] Casos que não foram devidamente incluídos ou processados no sistema pela falta de informações completas ou precisas.

[5] Casos que possuem informações conflitantes ou que não estão em conformidade com os critérios estabelecidos para a doença.

[6] Casos em que não é possível determinar com certeza se a condição relatada corresponde à doença em questão, devido à falta de informações claras ou conclusivas.

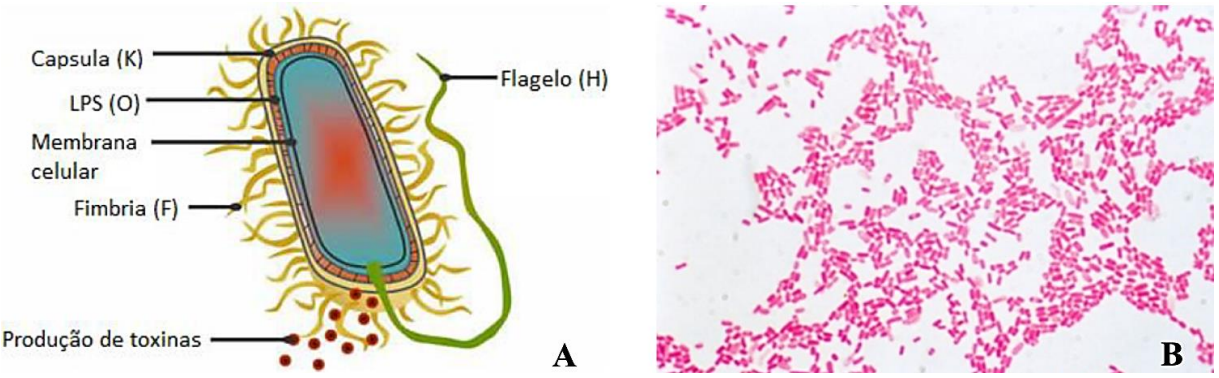
agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTHA no Brasil entre 2014 e 2023; excluídos registros ignorados, inconsistente e inconclusivos (n = 5.230).

De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2022), o queijo do tipo Minas Frescal por se classificar como um queijo de muita alta umidade, possui como limites de tolerância: até 100 unidades formadoras de colônia (UFC) de estafilococos coagulase positiva por grama; até 100 UFC de *E. coli* por grama; ausência de enterotoxinas estafilocócicas e de *Salmonella*.

2.3 VIRULÊNCIA DA *Escherichia coli*

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 0,40,7 µm de largura. É classificada como Gram-negativa, anaeróbica facultativa com mobilidade variável e vive de forma comensal no intestino de seres humanos. Dentre os aspectos estruturais de *E. coli*, destacam-se a presença dos antígenos O (de parede celular), H (flagelar), F (fimbrial) e K (capsular). Apesar de grande parte das *E. coli* que habitam o intestino humano não serem patogênicas, existem grupos/sorotipos capazes de causar infecção intestinal, infecção do trato urinário e sepse (Koneman, 2008).

Figura 3 - Representações da morfologia da *Escherichia coli*

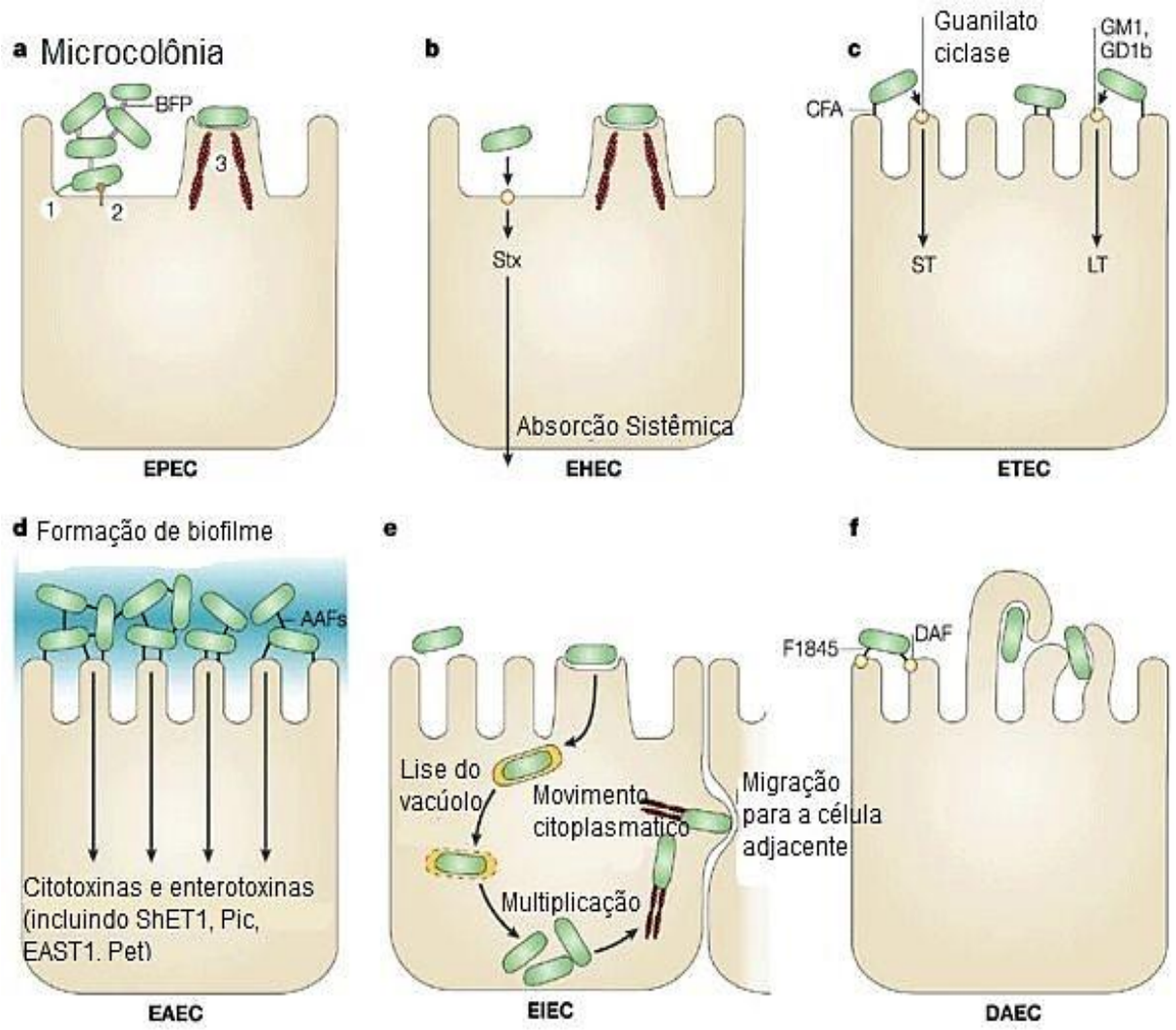


Fonte: A: Tutija, 2020; B: https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/coloração-de-gram-escherichia-coli-.

As categorias de *E. coli* patogênicas são determinadas conforme seus mecanismos de virulência, características sorológicas e sintomas das doenças. Assim, são classificadas em grupos de acordo com as suas propriedades (Figura 4) como *E.*

coli enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e a *E. coli* aderente difusa (DAEC) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2006).

Figura 4 - Esquemas de virulência da *Escherichia coli*



Fonte: Kaper *et al.*, 2004. Traduzido e adaptado.

Legenda: a) EPEC aderem aos enterócitos do intestino delgado, e induzem a lesão. Primeiramente ocorre a adesão (1), logo após ocorre a Translocação de proteínas por secreção tipo III (2) e por fim a formação de pedestal (3); b) a EHEC induz a lesão no cólon, há a produção de toxina Shiga (Stx), cuja absorção sistêmica leva a complicações fatais; c) ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado e induz diarreia aquosa pela secreção de enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST); d) EAEC adere aos epitélios do intestino delgado e grosso formando um biofilme espesso com elaboração de enterotoxinas e citotoxinas secretoras; e) EIEC invade a célula epitelial do cólon, lisa o fagossomo e se move através da célula por microfilamentos de actina. A movimentação pode ocorrer por disseminação direta célula a célula ou podem sair e reentrar na membrana plasmática basolateral; f) DAEC provoca um efeito característico de transdução de sinal nos enterócitos do intestino delgado formando longas projeções celulares, que envolvem as bactérias. AAF, fímbrias de aderência agregativa; BFP, pilus formador de feixe; CFA, antígeno do fator de colonização; DAF, fator acelerador

de decaimento; EAST1, *E. coli* enteroagregativa ST1; LT, enterotoxina termolábil; ShET1, enterotoxina 1 *de Shigella*; ST, enterotoxina termoestável.

Os mecanismos de patogenicidade estão relacionados com a forma que o microrganismo interage com as células do hospedeiro, podendo liberar toxinas e invadir os tecidos. Alguns dos mecanismos de virulência que podem estar presentes nas bactérias *E. coli* patogênicas são as adesinas e as exotoxinas, por exemplo, as STEC e ETEC produzem citotoxinas semelhantes a Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2) que são responsáveis por patologias como a colite hemorrágica e lesões intestinais, e produzem também a adesina intimina, codificada pelo gene *eae,* sendo responsável pela ligação da bactéria ao enterócito possibilitando a invasão do organismo. 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 (Ranjbar *et al*., 2018).

A infecção por *E. coli* de origem alimentar tem se tornado um sério problema de saúde pública e econômico. A utilização de antibióticos na produção animal é um fator que ocasionou o aumento à resistência aos medicamentos antimicrobianos, o que apresenta um perigo para a indústria de laticínios e consequentemente para a saúde do consumidor. 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).

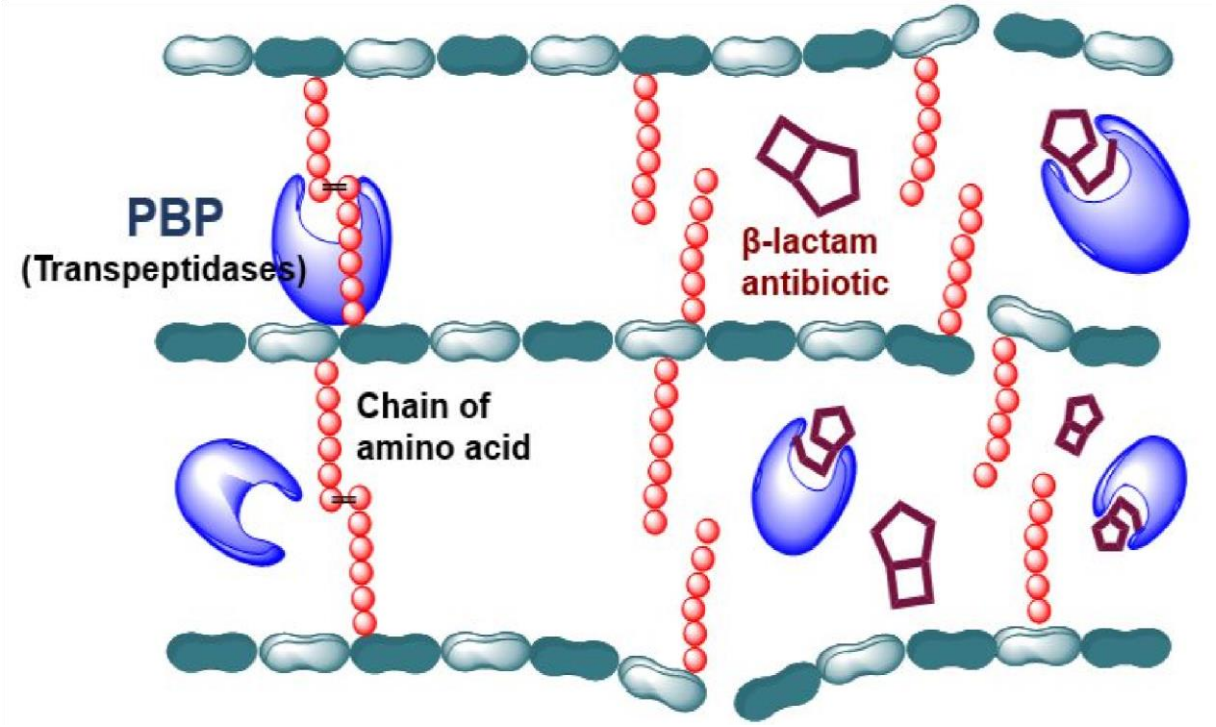
A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) define a resistência antimicrobiana como a capacidade reduzida ou a incapacidade do agente antimicrobiano em inibir o crescimento de uma bactéria o que pode levar a falha na terapia e agravamento da infecção. A ampla utilização de antibióticos de segunda ou terceira geração para o tratamento de infecções bacterianas contribui substancialmente para a resistência antimicrobiana e o surgimento de *E. coli* patogênica resistente a múltiplas drogas e produtora de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Ullah *et al*., 2024).

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS β-LACTÂMICOS

A resistência a antimicrobianos é um mecanismo das bactérias que ocorre naturalmente, porém esse problema foi intensificado pelo uso excessivo e incorreto desses medicamentos. Assim, tem aumentado a capacidade das bactérias de resistir aos antibióticos e passar adiante essa habilidade, como resultado, os medicamentos se tornam ineficazes e a infecção persiste no indivíduo aumentando o número de óbitos e a possibilidade de infectar outras pessoas (OMS, 2022).

Os β-lactâmicos são uma classe de antibióticos essenciais para o tratamento de infecções, sendo caracterizados por um núcleo de anel β-lactâmico. Os β-lactâmicos são classificados por suas frações em quatro famílias principais: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Eles atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana ao se ligarem às transpeptidases do tipo proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), impedindo assim a formação das ligações entre as cadeias peptídicas de peptideoglicano levando a lise e morte celular (Figura 4). Atualmente cepas de *E. coli* adquiriram resistência aos β-lactâmicos por produzirem enzimas chamadas β-lactamases que hidrolisam o anel β-lactâmico e tornam essas drogas ineficazes (Nauta *et al*., 2021).

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação dos antimicrobianos β-lactâmicos



Fonte: SHIN *et al*., 2016.
Legenda: PBP: proteínas ligadoras de penicilinas; β-lactam antibiotic: antibiótico β-lactâmico; Chain of amino acid: Cadeia de aminoácido.

A resistência das cepas de *E. coli* aos antimicrobianos β-lactâmicos pode ocorrer através da transferência horizontal de genes (THG), da mutação e da seleção. A THG é o principal mecanismo de aquisição de genes de resistência por meio de plasmídeos, transposons ou integrons. 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 β-lactamase pode fazer com que ele seja mais expresso e dessa maneira aumentar a resistência aos β-lactâmicos. A mutação também pode mudar a forma ou a atividade das transpeptidases, que são as enzimas alvo dos β-lactâmicos. 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 β-lactâmicos pode selecionar cepas de *E. coli* que possuem genes de resistência ou até mesmo transpeptidases mutadas. Esses elementos genéticos facilitam a disseminação de genes de resistência antimicrobiana entre diferentes cepas de *E. coli* e outras espécies bacterianas (Foudraine *et al*., 2021; Russ *et al*., 2020).

As β-lactamases de espectro estendido (do inglês *Extended Spectrum β-lactamase* - ESBLs) são capazes de hidrolisar cefalosporinas como, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima e cefepime e monobactams (aztreonam). As cepas de *E. coli* ESBLs produzem as β-lactamases CTX-M, TEM e SHV e são codificadas pelos genes *bla*-$_{\text{CTX-M}}$, *bla*-$_{\text{SHV}}$ e *bla*-$_{\text{TEM}}$, sendo CTX-M a mais frequente em *E. coli*. Esses genes são frequentemente encontrados em plasmídeos (Ali, *et al*., 2024; Castanheira, *et al*., 2021).

As cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs são causas frequentes de infecções e representam desafios importantes como, a falha terapêutica causada pela resistência a antimicrobianos, a transmissão dessas bactérias multirresistentes, além da alta morbidade e mortalidade associada a esse tipo de infecção (Romyasamit *et al.*, 2024*)*.

A crescente incidência de cepas de *E. coli* em amostras alimentares, como o queijo artesanal, evidencia a necessidade da detecção dos genes envolvidos nos mecanismos de resistência antibacteriana como o *bla*-$_{\text{CTX-M}}$, *bla*-$_{\text{SHV}}$ e *bla*-$_{\text{TEM}}$, a utilização de técnicas moleculares pode fornecer informações sobre a epidemiologia e o impacto dessa prevalência sobre a saúde pública (Chaudhary; Jadhav; Banjara, 2023).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a presença de genes de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal comercializados em feiras permanentes no Distrito Federal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a técnica de PCR para avaliar a presença do gene de virulência *uidA* em cepas *de Escherichia coli;*
- Realizar a técnica de PCR para avaliar a presença do gene de resistência *bla-*$_{CTX-M}$ em cepas *de Escherichia coli;*
- Realizar a técnica de PCR para avaliar a presença do gene de resistência *bla-*$_{SHV}$ em cepas *de Escherichia coli;*
- Realizar a técnica de PCR para avaliar a presença do gene de resistência *bla-*$_{TEM}$ em *cepas de Escherichia coli.*

4 JUSTIFICATIVA

Considerando que o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos β-lactâmicos é uma grande preocupação em saúde pública, é de extrema importância a identificação desses genes em alimentos como o queijo Minas Frescal. Sobretudo por ser um derivado do leite com alta comercialização e consumo no país. Além disso, vale destacar que a resistência antimicrobiana pode ser transmitida aos seres humanos através da cadeia alimentar.

5 MÉTODOS

5.1 COLETA DE AMOSTRAS E ANTIBIOGRAMA

Foram analisadas 104 cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de 22 amostras de queijos do Tipo Minas Frescal de produção artesanal, coletados em feiras permanentes do Distrito Federal entre o período de outubro de 2019 a janeiro de 2020.

Os dados utilizados no antibiograma são uma continuação das análises feitas por Rodrigues (2021). Vale ressaltar que as classes de antimicrobianos utilizadas foram: aminoglicosídeo (gentamicina), anfenicol (Cloranfenicol), β-lactâmicos (amoxicilina e ácido clavulânico, cefotaxima, ceftadizima e imipenem), quinolona (Ciprofloxacino), sulfonamida e tetraciclina.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi realizado o preparo das amostras, que consistiu em cultivar por 16-24 h 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

Para a confirmação genética das cepas de *Escherichia coli* foi utilizado o gene de virulência *uid*A, considerado um gene marcador de *E. coli*, por codificar uma β-glucoronidase exclusiva dessa espécie (Bandekar; Godambe; Shashidhar, 2017). A fim de avaliar a presença dos genes de resistência foram utilizados oligonucleotídeos

de *bla*-$_{CTX-M}$, *bla*-$_{SHV}$ e *bla*-$_{TEM}$, genes codificadores de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Gundran *et al*., 2019). O método utilizado para as análises moleculares se baseou no procedimento laboratorial denominado Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), capaz de amplificar múltiplas cópias do material genético pesquisado o que possibilita a sua visualização. O processo da PCR ocorre através da ação da enzima polimerase I, que resulta na desnaturação e rearranjo de curtas sequências de DNA da região genômica de interesse, facilitando a identificação e visualização (ANVISA, 2019). As sequências de oligonucleotídeos e tamanho (pb) dos genes utilizados estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequência de oligonucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados para identificação dos genes *bla*-CTX-M, *bla*-SHV, *bla*-TEM e *uid*A

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho (pb)	Condições da PCR	Referência
bla-CTX-M	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	592	Desnaturação inicial à 94ºC por 1 min; 36 ciclos de desnaturação à 94ºC por 30 s; anelamento à 58ºC por 1 min; extensão à 72ºC por 1 min; 72ºC por 10 min para extensão final	(Gundran *et al*., 2019)
bla-SHV	F: TCGGGCCGCGTAGGCATGAT R: AGCAGGGCGACAATCCCGCG	628	Desnaturação inicial à 95ºC por 3 min; 35 ciclos de desnaturação à 94ºC por 1 min; anelamento à 55ºC por 1 min; extensão à 72ºC por 1 s; 72ºC por 7 min para extensão final	(Gundran *et al*., 2019)
bla-TEM	F: TTGGGTGCACGAGTGGGTTA R: TAATTGTTGCCGGGAAGCTA	506	Desnaturação inicial à 95ºC por 3 min; 35 ciclos de desnaturação à 94ºC por 1 min; anelamento à 55ºC por 1 min; extensão à 72ºC por 1 s; 72ºC por 7 min para extensão final	(Gundran *et al*., 2019)
*uid*A	F: TGGTAATTACCGACGAAAACGGC R: ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	162	Desnaturação inicial à 95˚C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 95˚C por 1 min; anelamento a 60˚C por 1 min; 72˚C por1 min para a extensão final	(Molina *et al*., 2015)

Fonte: Autoria própria, 2024.
Legenda: F: *foward* (5′→3′); R: *reverse* (5′→3′); pb: pares de base; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.

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-MIP0-2-1 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 *bla*-CTX-M, *bla*-SHV, *bla*-TEM *e uid*A que podem 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 na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Reagente	**Concentração final**	**bla-$_{SHV}$**	**bla-$_{CTX-M}$**	**bla-$_{TEM}$**	**uidA**
Água MiliQ®	q.s.p 25 µL	15,2	13,34	13,85	13,85
Tampão Taq	10x	2,5	2,5	2,5	2,5
$MgCl_2$ (mM)	50 mM	0,4	0,76	1,25	1,25
dNTP (mM)	2,5 mM	1,5	2,0	2,0	2,0
Oligo F (µM)	10 pmol/µL	0,6	1,0	0,5	0,5
Oligo R (µM)	10 pmol/µL	0,6	1,0	0,5	0,5
Taq DNA pol (U/µL)	5 U/ µL	0,2	0,4	0,4	0,4
DNA molde	2,4 ng	0,8	0,8	0,8	0,8

Fonte: Autoria própria (2024).
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 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao perfil fenotípico de susceptibilidade antibacteriana das 104 cepas suspeitas de *E. coli* isoladas a partir das 22 amostras de queijos artesanais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana à amoxicilina e ácido clavulânico, cefotaxima, ceftadizima e imipenem de cepas de *E. coli* isoladas de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal

Antimicrobiano	**Resistente (%)**	**Intermediário (%)**	**Sensível (%)**
Amoxicilina‡	20 (19,23)	4 (3,85)	80 (76,92)
Perfil resistente*	24 (23,08)		
Cefotaxima	14 (13,46)	7 (6,73)	83 (79,81)
Perfil resistente*	21 (20,19)		
Ceftadizima	11 (10,58)	6 (5,77)	87 (83,65)
Perfil resistente*	17 (16,35)		
Imipenem	3 (2,88)	4 (3,85)	97 (93,27)
Perfil resistente*	7 (6,73)		
Perfil Multirresistente†	21 (20,19)		
Total de cepas	104		

Fonte: autoria própria, 2024.
Legenda: n: número de cepas; (%): percentagem em relação ao total de 104 cepas; ‡: associação de amoxicilina e ácido clavulânico; *: Soma dos resultados resistente e intermediário; †: Resistente a três ou mais classes de antimicrobianos com a presença de pelo menos um antimicrobiano do grupo dos β-lactâmicos

Dentre os resultados obtidos, a amoxicilina e ácido clavulânico (AMC) foi o antimicrobiano que apresentou o maior número de cepas de *E. coli* resistentes representado por 19,23% dos isolados. Na literatura são encontrados trabalhos que demonstram a resistência a AMC em cepas de *E. coli* isoladas de leite e seus derivados. Cardoso e Marin (2015) a partir de 38 amostras de queijos mussarela artesanais comercializados em Cruz das Almas, Bahia, isolaram 147 cepas de *E. coli*, das quais 18,37% foram resistentes a AMC. Pires *et al.* (2019) relataram que a partir de 30 amostras de queijo do tipo Minas Frescal comercializadas em supermercados

no Rio de Janeiro, foram identificadas 20% das cepas de *E. coli* com resistência a AMC. Já Bomfim *et al.* (2020) apresentaram um valor de 11,1% das cepas de *E. coli* resistentes a AMC, a partir da análise de 24 amostras de queijo Coalho de produção artesanal comercializadas em feiras livres no município de Vitória da Conquista, Bahia.

A resistência a AMC foi crescente nas últimas décadas, pois esse medicamento é comumente utilizado no tratamento de infecções humanas comunitárias, além de também fazer parte da quimioprofilaxia de rotina na produção do gado. A utilização indiscriminada de AMC é considerada como um problema de saúde pública, visto que, bactérias resistentes a esse antimicrobiano são cada vez mais frequentes (Ahmadi; Mardani; Amiri, 2020).

O maior perfil de sensibilidade das cepas de *E. coli* foi ao antibacteriano imipenem que apresentou 93,27% de cepas sensíveis. Loeza-Lara *et al*. (2023) obtiveram resultados semelhantes, onde das 100 amostras de queijo fresco coletadas em mercados municipais em Michoacán, México, 98,3% foram sensíveis ao imipenem. Parussolo *et al*. (2019) isolaram 117 cepas de *E. coli* de amostras de leite e de queijo serrano artesanal da região de Santa Catarina e observaram 97,44% de cepas sensíveis ao imipenem. Já Imre *et al*. (2022) verificaram a sensibilidade ao imipenem em 100% (n=43) dos isolados de *E. coli* a partir de 53 amostras de queijos de leite cru, artesanais e comercializados na região de Banat, Romênia.

Apesar da alta sensibilidade das cepas de *E. coli* ao imipenem obtida na análise, existe um alerta a saúde pública com o surgimento de resistência frente a este antibiótico, pois esse é um medicamento utilizado como última linha de defesa contra infecções de bactérias resistentes em ambiente hospitalar, e o surgimento de patógenos resistentes a medicamentos como o imipenem impacta no tempo de internação, no custo do tratamento e implica em intervenções terapêuticas mais agressivas (ANVISA, 2023).

A Tabela 2 apresenta os perfis de multirresistência das cepas de *E. coli,* que possuem pelo menos um antibiótico do grupo dos β-lactâmicos, sendo que para isso foi considerado amoxicilina e ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftadizima (CAZ) e imipenem (IPM).

Tabela 2 - Perfis de multirresistência antimicrobiana de cepas de *E. coli,* com a presença de pelo menos um antibiótico do grupo dos β-lactâmicos, isoladas a partir de amostras de queijo artesanal do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal

Perfil	Antimicrobiano	Nº de cepas (%)
1	SUL - AMC‡ - CIP	2 (1,92%)
2	SUL - TET - AMC‡	1 (0,96%)
3	SUL - CTX‡ - CIP	1 (0,96%)
4	SUL - TET - AMC‡ - CIP	2 (1,92%)
5	SUL - CTX‡ - TET - AMC‡	2 (1,92%)
6	SUL - CLO - AMC‡ - CIP	1 (0,96%)
7	SUL - CLO - TET - AMC‡	1 (0,96%)
8	SUL - CLO - TET - IPM‡ - CAZ‡	2 (1,92%)
9	SUL - CTX‡ -TET - AMC‡ - CIP	1 (0,96%)
10	SUL - CLO - CTX‡ - TET - CIP	1 (0,96%)
11	SUL - CTX‡ - TET - AMC‡ - CIP - CAZ‡	1 (0,96%)
12	SUL - CTX‡ - TET - GEN - AMC‡ - CIP	1 (0,96%)
13	SUL - CLO - CTX‡ - TET - GEN - AMC‡ - CAZ‡	1 (0,96%)

Fonte: autoria própria (2024).
Legenda: Nº: número total de cepas; ‡: β-lactâmicos; AMC: amoxicilina e ácido clavulânico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina; %: em relação as 104 cepas.

Os microganismos multirresistentes (MDR) podem ser definidos como aqueles resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (ANVISA, 2021). Na Tabela 2 são encontrados 13 perfis de multirresistência, com destaque para a resistência às sulfonamidas em todos eles. Além disso, tanto o AMC quanto a tetraciclina mostraram-se presentes em 77% dos perfis MDR.

Semelhante aos resultados encontrados nesse estudo, De La Rosa-Hernándes *et al*. (2018) relataram que a partir de 120 amostras de queijo fresco coletadas de mercados públicos na cidade de Pachuca, México, observou-se a presença de 23 cepas de *E. coli* diarreiogênica, das quais 100% apresentaram resistência a AMC, 43,5% resistência às sulfonamidas e 23% para tetraciclinas. Jafari-Sales, Hossein-Nezhad e Shahniani (2020) isolaram 60 cepas de *E. coli* a partir de 150 amostras de queijos comercializados em Marand, Irã, onde encontraram uma resistência de 100% das amostras à AMC e de 83,3% à sulfametoxazol e trimetroprima. Melo *et al.* (2015)

a partir de 36 isolados de *E. coli* de origem alimentar provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN/BA), observaram a resistência de 25% das cepas à tetracilina e 5,5% de resistência tanto à AMC quanto para sulfametoxazol e trimetoprima.

A alta resistência das cepas de *E. coli* aos fármacos testados é descrita globalmente. A Organização Mundial de Saúde (OMS), por meio da Vigilância Global de Resistência e Uso de Antimicrobianos apresentou relatórios mundiais com dados de 87 países, do ano de 2020, sobre o consumo e a resistência aos antimicrobianos, onde foi relatado que 20% das cepas isoladas de *E. coli* eram resistentes aos medicamentos de primeira e segunda linha no tratamento de infecções como a do trato urinário, representado por antibióticos da classe dos β-lactâmicos, sulfonamidas e quinolonas (OMS, 2022).

A resistência a sulfonamidas presente em todos perfis MDR, além da alta porcentagem de resistência a AMC e tetraciclina demonstram o impacto da utilização de antimicrobianos no tratamento de infecções humanas e na produção animal. É estimado que cerca de 250 mil toneladas de antibacterianos são consumidas anualmente em todo o mundo, sendo que 70% desse consumo é destinado aos animais e apenas 30% a humanos (Abrantes; Nogueira, 2022; Brasil, 2023; Morais; Silva, 2017; O'Neill, 2016).

No Quadro 3 são apresentados os resultados das análises fenotípicas e genotípicas das cepas suspeitas de *E. coli.* Observou-se que das 104 cepas com perfil fenotípico de resistência antibacteriana a classe dos β-lactâmicos, 77,8% (81/104) foram confirmadas como *E. coli* pela presença do gene de virulência *uid*A, e dessas, 79 cepas de *E. coli* seguiram para detecção dos genes de resistência *bla*-$_{\text{CTX-M}}$, *bla*-$_{\text{SHV}}$ e *bla*-$_{\text{TEM,}}$ visto que as demais possuiam material genético insuficiente para o estudo.

Quadro 3 - Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal

Cepas de *E.coli*	**Detecção do gene *uid*A***	**Detecção do gene *bla*-$_{CTX-M}$ †**	**Detecção do gene *bla*-$_{SHV}$ †**	**Detecção do gene *bla*-$_{TEM}$ ‘**	**Antibiograma resistente ‡**	**Multirresistente Fenotípico**
1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
2	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Sim	Sim
3	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
4	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
5	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Sim	Sim
7	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Sim
10	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Sim	Não
12	Positivo	Negativo	-	Positivo	Sim	Sim
13	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
14	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
15	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Não	Não
16	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Sim
17	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Sim
18	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
19	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Sim
20	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Não
21	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Sim
22	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Sim
23	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Sim
24	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Não	Sim
25	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
26	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
27	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não	Não
28	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
29	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não	Não
30	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
31	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
32	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Sim
33	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
34	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Não
35	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
36	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Não	Não
37	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não

Cepas de *E.coli*	Detecção do gene *uid*A*	Detecção do gene *bla*-$_{CTX-M}$ †	Detecção do gene *bla*-$_{SHV}$ †	Detecção do gene *bla*-$_{TEM}$ †	Antibiograma resistente ‡	Multirresistente Fenotípico
38	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Sim	Sim
39	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
40	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Não
41	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
42	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Sim	Sim
43	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
44	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não	Não
45	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Não
46	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
47	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
48	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Não
49	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
50	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Não
51	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
52	Positivo	Positivo	Negativo	-	Não	Não
53	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
54	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Sim	Sim
55	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Não	Não
56	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Sim
57	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
58	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
59	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
60	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Não	Não
61	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Não	Não
62	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
63	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
64	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
65	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
66	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
67	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
68	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
69	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não	Não
70	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
71	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
72	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não	Não
73	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
74	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
75	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
76	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Não
77	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não	Não

Cepas de *E.coli*	Detecção do gene *uid*A*	Detecção do gene *bla*-$_{CTX-M}$ †	Detecção do gene *bla*-$_{SHV}$ †	Detecção do gene *bla*-$_{TEM}$ †	Antibiograma resistente ‡	Multirresistente Fenotípico
78	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
79	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Não	Não
80	Positivo	-	-	Negativo	Sim	Sim
81	Positivo	-	Negativo	-	Não	Não

Fonte: autoria própria (2024).
Legenda: Total de 81 cepas; *: gene de identificação; †: gene de resistência; ‡: resistência a classe dos β-lactâmicos no antibiograma (CLSI, 2020); - : não se aplica.

Dos resultados obtidos pela análise molecular das 79 cepas de *E. coli*, foi observado que 6,3% (5/79) das cepas continham os 3 genes de resistência *bla-*$_{CTX-M}$, *bla-*$_{SHV}$ e *bla-*$_{TEM}$, sendo o gene *bla-*$_{CTX-M}$ o mais frequente, presente em 60,7% (48/79) das cepas, seguido por *bla-*$_{TEM}$ presente em 43% (34/79) das cepas e *bla-*$_{SHV}$ presente em 26,5% (21/79) das cepas. Ainda, 89,8% (71/79) das cepas de *E. coli* possuíam pelo menos um gene de resistência e 23,9% (17/71) das cepas tiveram um perfil multiresistente no antibiograma. Também foram identificadas 67% (53/79) de cepas de *E. coli* não resistentes aos antimicrobianos β-lactâmicos testados no antibiograma e que apresentaram algum dos genes de resistência testados. Por fim, 12,6% (10/79) das cepas de *E. coli* não apresentaram nenhum gene de resistência e apesar da ausência do gene de resistência, 50% (5/10) delas apresentaram-se resistentes no antibiograma aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos.

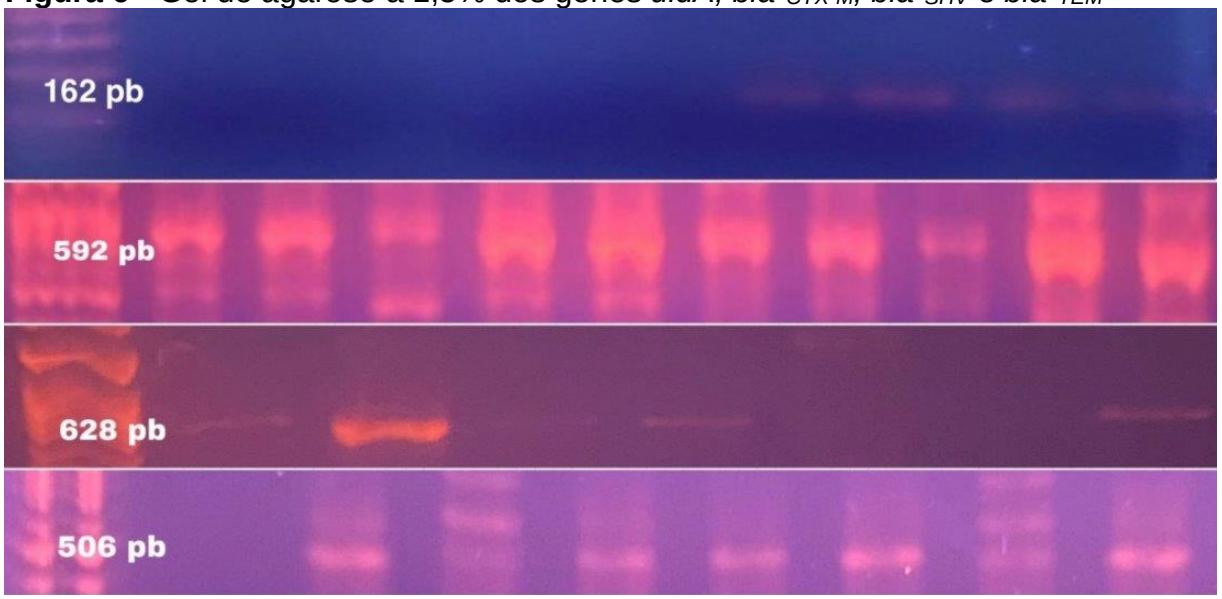
A produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) pelas bactérias é um dos mecanismos de resistência mais prevalentes em bacilos Gram-negativos e essas enzimas são codificadas pelos genes de resistência *bla-*$_{CTX-M}$*, bla-*$_{SHV}$ e *bla-*$_{TEM}$. As bactérias que produzem ESBL são capazes de hidrolisar a maioria dos β-lactâmicos, como cefuroxima, cefotaxima, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam, mas podem ser inibidas utilizando inibidores de β-lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (EUCAST, 2022; Ojdana *et al*., 2014).

Clement *et. al.* (2021), a partir de 638 amostras de carne coletadas aleatoriamente no mercado varejista em Portugal, isolaram 109 cepas de *E. coli* que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira geração, das quais 79,8% (87/109) apresentaram um fenótipo de ESBL, sendo que dessas cepas de *E. coli* resistentes, 55,9% (60/109) possuíam o gene de resistência *bla-*$_{CTX-M}$*,* 15,6% (17/109)

apresentaram o gene *bla-$_{SHV}$* e 11% (12/109) apresentaram o gene *bla-$_{TEM}$*. Ombarac *et. al.* (2018), por meio da análise de 187 produtos lácteos procedentes do Egito, avaliaram a resistência antibacteriana e realizaram a caracterização de genes relacionados com resistência antibacteriana em 222 isolados de *E. coli*. Os autores observaram que 18,9% (42/222) das cepas apresentaram resistência a ampicilina, e dessas, 95,2% (40/42) possuíam o gene de resistência *bla-$_{TEM}$*, 21,4% (9/42) apresentavam o gene de resistência *bla-$_{CTX-M}$* e 7,14% (3/42) apresentavam o gene de resistência bla-$_{SHV}$. Já no estudo realizado com 184 cepas de *E. coli* clínicas isoladas de 650 amostras provenientes do hospital Mayo, em Lahore, Paquistão, foi relatada a presença de genes de resistência a ESBL em 82,1% (147/184) dos isolados de *E. coli*, sendo o gene *bla-$_{SHV}$* o mais prevalente, presente em 24,9% das cepas (36/147), seguido por *bla-$_{CTX-M}$* presente em 17,7% (26/147) das cepas e *bla-$_{TEM}$* presente em 4,8% (7/147) das cepas (Gondal *et. al*., 2021).

A figura 5 apresenta os géis de agarose com a visualização dos genes *uidA, bla-$_{CTX-M}$, bla-$_{SHV}$* e *bla-$_{TEM}$.*

Figura 6 - Gel de agarose a 1,5% dos genes *uidA, bla-$_{CTX-M}$, bla-$_{SHV}$* e *bla-$_{TEM}$*



Fonte: autoria própria (2024).
Legenda: A: gene de virulência *uidA*; B: gene de resistência *bla-$_{CTX-M}$*; C: gene de resistência *bla-$_{SHV}$*; D: gene de resistência *bla-$_{TEM}$*; pb: pares de bases. Visualizado em transiluminador UV-Visível.

O aumento da utilização de antimicrobianos corrobora com a possibilidade de resistência bacteriana, visto que, os genes de resistência podem estar localizados em plasmídeos móveis do DNA facilitando a transferência genética. Os genes de

resistência *bla-*$_{CTX-M}$*, bla-*$_{SHV}$ e *bla-*$_{TEM}$ são amplamente distribuídos entre as bactérias patogênicas e estão associados, principalmente, à resistência contra cefalosporinas de 3ª geração, monobactâmicos e penicilinas, impactando na eficácia e no custo do tratamento de infecções, o que demonstra a necessidade de uma vigilância sanitária e epidemiológica mais rigorosa e a promoção do uso racional de antibióticos, na produção animal e no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares (Chaudhary; Jadhav; Banjara, 2023; Evangelista-Barreto, *et al.* 2016; Ullah *et al*., 2024).

7 CONCLUSÃO

Este estudo trouxe resultados que reforçam o impacto que a segurança alimentar e microbiológica deve ter na produção e comercialização de queijos artesanais. A alta detecção dos genes resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de amostras de queijos de produção artesanal comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal indicam potencial capacidade patogênica desses microrganismos e de disseminação desses mecanismos de resistência antimicrobiana. Os genes de resistência *bla-*$_{CTX-M}$, *bla-*$_{TEM}$ e *bla-*$_{SHV}$ estavam presentes, respectivamente, em 60,7%, 43,0% e 26,5% das cepas de *E. coli*, além de haver 6,3% dos isolados com a presença dos três genes de resistência.

Estes dados evidenciam um problema em ascensão para a saúde pública, visto que, o queijo artesanal é um alimento amplamente consumido pela população e a sua contaminação com microrganismos resistentes a antimicrobianos traz o risco de disseminação desses genes através da cadeia alimentar. Tais resultados reforçam a necessidade de uma regulamentação mais rígida e fiscalização eficaz nos processos de produção e comercialização de queijos artesanais, além de estratégias educativas para os produtores sobre os riscos microbiológicos associados a esses alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. DA R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. **RBAC**, v. 53, n. 3, 2022.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Consumo per capta de queijos no Brasil.** Disponível em: https://www.abiq.com.br/home_queijos.asp. 2021.

AHMADI, E.; MARDANI, K.; AMIRI, A. Molecular detection and antimicrobial resistance patterns of Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolated from bovine subclinical mastitis milk samples in Kurdistan, Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 75, n. 2, p. 169–177, 2020.

ALI, R. *et al*. Phenotypic and genotypic characterization of extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* harboring carbapenem and colistin resistant genes from poultry farms in Egypt. **Open Veterinary Journal**, v. 14, n. 1, p. 459, 2024.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, volume 1.** 6ª Ed. Brasília, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde – Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2021.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. 2023. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/DiretrizGerenciamentoAntimicrobianosANVISA2023FINAL.pdf. Acesso em: 18 set. 2024.

ARAÚJO, J. P. A. *et al.* Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845–1860, 2020.

BESHEARSE, E. *et al.* Attribution of illnesses transmitted by food and water to comprehensive transmission pathways using structured expert judgment, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 182–195, 2021.

BOMFIM, A. P. *et al*. Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos Coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 27, p. e020015, 2020.

BOOR, K. J. *et al*. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9933–9951, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2024**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024/view. Acesso em: 08 maio 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022.** Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, v.126, 6 jul. 2022. Seção 1 p. 235, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Atualização sobre uso racional de antimicrobianos e boas práticas de produção**. Brasília: MAPA, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPrticasdeProduo.pdf. Acesso em: 16 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019**. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 jul. 2019a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019.** Dispõe sobre o regulamento para enquadramento de produtores fornecedores de leite para fabricação de produtos lácteos artesanais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 dez. 2019b.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 mar. 2017a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017.** Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Diário Oficial da União, Brasília, DF, v.154, n. 42, 3 mar. 2017b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Dispõe sobre os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 mar. 1996.

CARDOSO, P.; MARIN, J. M. Resistência antimicrobiana de isolados de *escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no brasil. **Ars Veterinaria**, v. 30, n. 2, p. 104, 2015.

CASTANHEIRA, M. *et al*. Extended-spectrum β-lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, p. dlab092, 2021.

CHAUDHARY, M. K.; JADHAV, I.; BANJARA, M. R. Molecular detection of plasmid mediated blaTEM, blaCTX-M,and blaSHV genes in Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) *Escherichia coli* from clinical samples. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,** v. 22, n. 1, p. 33, 2023.

CHÁVEZ-MARTÍNEZ, A. *et al.* Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 703–710, 2019.

CLEMENTE, L. et al. Prevalence and characterization of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* from fresh meat in Portugal. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 1333, 2021.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Antibiograma – Interpretação das zonas de inibição e concentrações inibitórias mínimas. Edition 2020. **CLSI guideline.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

DE CASTRO, C. R. T. *et al*. Produção, qualidade microbiológica e aspectos nutricionais do queijo artesanal de Carvalhos-MG. 2023. **Embrapa Gado de Leite, 2023.** Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1153635/1/Producao-qualidade-microbiologica-e-aspectos-nutricionais-do-queijo-artesanal-de-Carvalhos-MG.pdf. Acesso em: 05 maio 2024.

DE LA ROSA-HERNÁNDEZ, M. C. et al. Presence of multidrug-resistant Shiga toxin–producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli*, and enterotoxigenic *Escherichia coli* on fresh cheeses from local retail markets in Mexico. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 11, p. 1748–1754, 2018.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica, 2022**. Disponível em: https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Orientac%CC%A7o%CC%83es-do-EUCAST-para-a-detecc%CC%A7a%CC%83o-de-mecanismos-de-resiste%CC%82ncia-e-resiste%CC%82ncias-especi%CC%81ficas2.pdf. Acesso em: 11 nov. 2024.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Artisan cheese as vehicle of contamination *Escherichia coli* and coagulase-positive staphylococci antimicrobial resistance. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal,** v. 10, n. 1, 2016.

FERROCINO, I.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Investigating dairy microbiome: an opportunity to ensure quality, safety and typicity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, p. 164–170, 2022.

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.

GODAMBE, L. P.; BANDEKAR, J.; SHASHIDHAR, R. Species specific PCR based detection of *Escherichia coli* from Indian foods. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, 2017.

GUNDRAN, R. S. *et al.* Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended- spectrum β lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

IMRE, K. *et al*. Occurrence, pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheese commercialized in Banat region, Romania. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 721, 2022.

JAFARI-SALES, A.; HOSSEIN-NEZHAD, P.; SHAHNIANI, A. Antibiotic susceptibility assessment of *Escherichia coli* isolated from traditional cheeses in Marand, Iran. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 8, n. 3, p. 236-24, 2020.

KAMIMURA, B. A *et al*. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, 2019.

KAPER, J., NATARO, J. MOBLEY, H. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology 2**, p. 123–140, 2004.

KONEMAN, Elmer W. Winn, Washington C. **Diagnóstico microbiológico de Koneman: Texto e atlas colorido.** 6. Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; DOS SANTOS, R. F. S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105–113, 2017.

LOEZA-LARA, P. D. *et al*. Frequency and characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from Mexican fresh cheese. **Food Science and Technology**, v. 43, p. e108222, 2023.

Manual MSD. **Coloração de Gram (Escherichia coli)**. Disponível em: https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/coloração-de-gram-escherichia-coli-. Acesso em: 28 jan. 2025.

MELO, D. B. et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1165–1170, 2015.

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

MORAIS, D. F.; SILVA, G. S. Sulfametoxazol trimetoprim susceptibilidade e resistência bacteriana: uma revisão teórica. **Boletim Informativo Geum,** v. 8, n. 3, p. 9, 2017.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NAUTA, K. M. *et al*. The penicillin-binding protein PbpP is a sensor of β-lactams and is required for activation of the extracytoplasmic function σ factor σP in *Bacillus thuringiensis*. **Mbio**, v. 12, n. 2, p. e00179-21, 2021.

NEWSLETTER do **Observatório do Consumidor Ano 2, nº 19 - Setembro/2023**. Disponível em: https://infogram.com/observatorio-do-consumidor-set23-1h7v4pwg7evvj6k. Acesso em: 05 maio de 2024.

OJDANA, D. *et al*. The Occurrence of *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{SHV}$, and *bla*$_{TEM}$ Genes in Extended-Spectrum *β*-Lactamase-Positive Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. **International Journal of Antibiotics**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

OLIVEIRA, P. O. DE *et al*. Revisão: Implantação das boas práticas de fabricação na indústria Brasileira de alimentos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e35810111687, 2021.

OMBARAK, R. A. *et al*. Prevalence and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 2, p. 226–232, 2018.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance Chaired**, London, p. 1-84, 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2022. **Relatório do Sistema Global de Vigilância de Resistência e Uso de Antimicrobianos (GLASS) 2022**.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2023. Organização Mundial da Saúde. **Foodborne diseases**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 08 maio 2024.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2022. **Relatório sinaliza aumento da resistência a antibióticos em infecções bacterianas em humanos**. 9 dez 2022. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2022-relatorio-sinaliza-aumento-da-resistencia-antibioticos-em-infeccoes-bacterianas. Acesso em: 31 maio 2024.

PARUSSOLO, L. *et al*. Detecção de genes de virulência e perfis de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de leite cru e queijo artesanal no Sul do Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 163–178, 2019.

PIRES, B. A. D. Identificação, susceptibilidade antimicrobiana e identificação Filogenética de *escherichia coli* isoladas de queijo minas frescal. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **Fundação Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, 2017.

PIRES, B. A. D. *et al.* Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 7, n. 3, p. 86–91, 2019.

RANJBAR, R. *et al.* Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 2018.

ROCHA, R. *et al.* Microbiological characterization of protected designation of origin Serra da Estrela cheese. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2008, 2023.

RODRIGUES, F. S. L *et al*. **Qualidade microbiológica de queijos tipo Minas Frescal comercializados no Distrito Federal e determinação da resistência antimicrobiana de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas desses queijos.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) - Universidade de Brasília, 2021.

ROMYASAMIT, C. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae:* insights from a tertiary hospital in Southern Thailand. **Microbiology Spectrum**, 2024.

RUSS, D. *et al*. Escape mutations circumvent a tradeoff between resistance to a beta-lactam and resistance to a beta-lactamase inhibitor. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2029, 2020.

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.

SHIN, W. S. **Combination antibacterial therapy against β-lactam drug resistance.** 2016. Tese de Doutorado. University of Minnesota.

Tutija, J. F. Identificação *Escherichia Coli* Diarreiogênicas em Bezerros. **Dissertação (Mestrado Em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul, 2020.**

ULLAH, S. *et al*. Multiple-drug resistant Shiga toxin-producing *E. coli* in raw milk of dairy bovine. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 3, p. 64, 2024.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). ***E. coli*****.** 12 dez. 2018. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli. Acesso em: 31 maio 2024.