

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS  
GERAIS – *CAMPUS* BAMBUÍ  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Flávia Silveira Santos

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENCONTRADOS EM MANANCIAS USADOS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS  
ARTESANAL NA SERRA DA CANASTRA**

**BambuÍ - MG  
2026**

**ANA FLÁVIA SILVEIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENCONTRADOS EM MANANCIAS USADOS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS  
ARTESANAL NA SERRA DA CANASTRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí, para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Gustavo Augusto Lacorte

Coorientador: Raphael Steinberg da Silva

**Bambuí - MG  
2026**

---

**Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - Campus Bambuí**

---

S237a Santos, Ana Flávia Silveira.

Avaliação do potencial patogênico de isolados de *Escherichia coli* encontradas em mananciais usados na produção de Queijo Minas Artesanal na Serra da Canastra [manuscrito] / Ana Flávia Silveira Santos – 2026.

80 f. : il. ; color.

Orientador: Gustavo Augusto Lacorte.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus Bambuí*, 2026.

1. *Escherichia coli*. 2. Coliforme. 3. Mananciais. 4. Genes de virulência. I. Lacorte, Gustavo Augusto. II. Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus Bambuí*. III. Título.

CDD 637.3

---

**Catálogo: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS Campus Bambuí

Diretoria de Ensino  
Departamento de Ciências e Linguagens  
Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05 -  
Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG  
37 3431 4900 - www.ifmg.edu.br

Ana Flávia Silveira Santos

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* ENCONTRADOS EM MANANCIAS  
USADOS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL NA SERRA DA CANASTRA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *Campus* Bambuí para obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em 09/01/2026, pela banca examinadora:

Gustavo Augusto Lacorte

(Orientador)

Raphael Steinberg da Silva

(Coorientador)

Jonas Guimarães e Silva

(Membro avaliador)

Lidiane Figueiredo dos Santos

(Membro avaliador)

Bambuí, 09 de janeiro de 2026.



Documento assinado eletronicamente por **Lidiane Figueiredo dos Santos, Professora EBTT**, em 09/01/2026, às 14:41, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Jonas Guimaraes E Silva, Professor**, em 09/01/2026, às 14:41, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Steinberg da Silva, Professor**, em 09/01/2026, às 14:42, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Augusto Lacorte, Professor**, em 09/01/2026, às 14:42, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **2568444** e o código CRC **AA04B602**.

23209.005027/2025-14

2568444v1

*Dedico este trabalho à minha família e aos meus  
amigos, que tornaram essa caminhada possível,  
mesmo nos momentos mais difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, em especial ao meu avô Vanir, à minha mãe, à minha madrinha Sandra e aos meus irmãos, por todo o amor, incentivo, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos desta jornada.

Ao meu orientador, Gustavo Lacorte; ao meu coorientador, Raphael Steinberg; em especial à professora Fabiana Couto e à técnica Livia Santos, pela paciência, dedicação, ensinamentos e por acreditarem no meu potencial.

Aos professores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do IFMG - Campus Bambuí, por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem de forma significativa para minha formação.

Aos colegas e amigos, em especial à Kharen, à turma do Panebio, às meninas da República 4x4 e às Botequeiras do LP, que estiveram ao meu lado durante o percurso, tornando-o mais leve e repleto de aprendizados.

Ao IFMG – *Campus* Bambuí, pelo espaço de aprendizado e pelas oportunidades oferecidas, e à chapa do Diretório Acadêmico “Dutra Melo”, pelo companheirismo, colaboração e convivência ao longo desta caminhada.

Àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo registrada a minha sincera gratidão.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

## RESUMO

O Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC) é um patrimônio cultural e econômico de Minas Gerais, produzido tradicionalmente com leite cru. Alguns empreendimentos dependem de água de mananciais para higienização de utensílios e manipulação do queijo, o que representa risco de contaminação microbiológica para o produto. Cepas da bactéria *Escherichia coli* podem apresentar genes de virulência que conferem potencial patogênico, incluindo toxinas associadas a diarreias e a quadros graves, como síndrome hemolítico-urêmica. Além disso, a *E. coli* é amplamente utilizada como indicador clássico de contaminação fecal do leite e de derivados lácteos. Este estudo avaliou 160 isolados geneticamente distintos de *E. coli* obtidos de 12 mananciais utilizados por produtores de QMAC localizados no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra, com o objetivo de verificar a presença dos genes de virulência: *stx1*, *stx2*, *cdt*, *estI* e *eltA*. Os resultados mostraram baixa prevalência de genes de virulência: gene *estI* (11,9%), *cdt* (5,6%) e apenas um registro para *stx1* (0,6%). Os genes *stx2* e *eltA* não foram detectados em nenhum dos 160 isolados avaliados. Apesar da baixa prevalência, a presença de genes associados à produção de toxinas evidencia a circulação de cepas com potencial patogênico nos mananciais avaliados, reforçando a necessidade de monitoramento contínuo da qualidade da água e de melhorias nas práticas do manejo hídrico na produção do QMAC. Os resultados também demonstram que os critérios microbiológicos vigentes, baseados apenas na contagem de coliformes, não contemplam a avaliação do potencial de virulência das cepas presentes, reforçando a necessidade constante de revisão de protocolos e legislações.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Coliforme. Mananciais. Genes de Virulência.

## ABSTRACT

The Canastra Artisanal Minas Cheese (QMAC) is a cultural and economic heritage of the state of Minas Gerais, traditionally produced from raw milk. Some production units rely on spring water for utensil sanitation and cheese handling, which represents a potential risk of microbiological contamination of the product. Strains of the bacterium *Escherichia coli* may harbor virulence genes that confer pathogenic potential, including toxins associated with diarrheal diseases and severe conditions such as Hemolytic Uremic Syndrome; moreover, *E. coli* is widely used as a classical indicator of fecal contamination in milk and dairy products. This study evaluated 160 genetically distinct *E. coli* isolates obtained from 12 springs used by QMAC producers located in the surroundings of the Serra da Canastra National Park, with the objective of investigating the presence of the virulence genes *stx1*, *stx2*, *cdt*, *estI*, and *eltA*. The results showed a low prevalence of virulence genes: *estI* (11.9%), *cdt* (5.6%), and only a single detection of *stx1* (0.6%). The *stx2* and *eltA* genes were not detected in any of the 160 isolates analyzed. Despite the low prevalence, the detection of genes associated with toxin production indicates the circulation of strains with pathogenic potential in the evaluated water sources, reinforcing the need for continuous monitoring of water quality and for improvements in water management practices in QMAC production. The findings also demonstrate that current microbiological criteria, based solely on coliform counts, do not address the assessment of the virulence potential of the strains present, underscoring the ongoing need to revise monitoring protocols and regulatory frameworks.

Keywords: *Escherichia coli*. Coliforms. Water sources. Virulence genes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões reconhecida como produtoras do QMAC	17
Figura 2 - Agroindústria Rural - Nº de estab. - Queijo e requeijão	19
Figura 3 - Agroindústria Rural - Quant. (t) - Queijo e requeijão	19
Figura 4 - Etapas do processo produtivo do Queijo Minas Artesanal.	20
Figura 5 - Toxina Shiga	30
Figura 6 - Mecanismo de ação das toxinas Shiga (Stxs) em infecções por STEC	31
Figura 7 - Fluxograma contendo a sequência das atividades realizadas	34
Figura 8 - Pontos de Coleta	35
Figura 9 - Criotubos contendo isolados de <i>Escherichia coli</i> preparados para armazenamento	37
Figura 10 - Reativação das amostras bacterianas para extração de DNA	38
Figura 11 - Técnica de estria de esgotamento em meio de cultura ágar MacConkey	44
Figura 12 - Coloração de Gram de isolado bacteriano obtido em Ágar MacConkey	44
Figura 13 - Perfis de bandas obtido pela técnica GTG-5 da Estação Úmida	45
Figura 14 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene <i>estI</i> (111 bp).	47
Figura 15 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene <i>cdt</i> (108 bp)	47
Figura 16 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene <i>stx1</i> (180 bp)	48
Figura 17 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene <i>stx2</i> (255 bp)	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Queijos de baixa umidade (umidade menor que 36%)	23
Tabela 2 - Queijos de média umidade (36% < umidade < 46%).	23
Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação dos genes de virulência	41
Tabela 4 - Amostras positivas para genes de virulência de Escherichia coli na Estação Seca	48
Tabela 5 - Amostras positivas para genes de virulência de Escherichia coli na Estação Úmida	49
Tabela 6 - Distribuição das amostras positivas por gene, com percentuais sazonais e gerais	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*E. coli* - *Escherichia coli*

QMAC - Queijo Minas Artesanal Canastra

QMA - Queijo Minas Artesanal

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária

APROCAN - Associação dos Produtores do Queijo Canastra

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Parna Canastra - Parque Nacional da Serra da Canastra

Stx1 - Toxina Shiga 1

Stx2 - Toxina Shiga 2

Cdt - Citotoxina diftérico-like

East1 - Enterotoxina termoestável 1

LT-A - Enterotoxina termo-lábil

RTIQ - Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

LPS - Lipopolissacarídeo

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EAggEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC - *Escherichia coli* entero-hemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

AIEC - *Escherichia coli* aderente-invasiva

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

NTEC - *Escherichia coli* necrotóxica

FDA - *U.S. Food and Drug Administration*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

LPS - Lipopolissacarídeo

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

CH - Colite hemorrágica

SHU - Síndrome hemolítica urêmica

OMS - Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. Contextualização.....	15
1.2 Justificativa.....	16
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo geral.....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
3.1 Serra da canastra.....	18
3.1.1 Produção de Queijo.....	19
3.1.2 Aspectos Culturais e Riscos Associados à Produção do Queijo Minas Artesanal.....	22
3.2 Microrganismo.....	23
3.2.1 Microrganismo indicadores de contaminação na produção alimentícia.....	24
3.2.2 Bactérias patogênicas.....	26
3.2.3 Água como veículo de transmissão e avaliação microbiológica na produção de alimentos.....	26
3.2.4 Genes de virulência.....	27
3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	28
3.3.1. Descrição geral do grupo.....	28
3.3.2. <i>E. coli</i> como agente de <i>Foodborne diseases</i> .....	28
3.3.3. Genes de virulência em <i>E. coli</i> .....	30
3.3.3.1 Toxina Shiga 1.....	30
3.3.3.2 Toxina Shiga 2.....	31
3.3.3.2.1 Mecanismo de ação das toxinas Shiga (Stxs).....	32
3.3.3.3 Toxina <i>Distensora Citoletal</i> .....	33
3.3.3.4 Enterotoxina termoestável 1.....	34
3.3.3.5 Enterotoxina termo-lábil.....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Contextualização e origem das amostras.....	36
4.2 Extração de DNA.....	38
4.3 Caracterização molecular por PCR ( <i>GTG-fingerprinting</i> ).....	41
4.4 Amplificação de genes de virulência.....	42
4.5 Eletroforese em gel de agarose.....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Contextualização

Os microrganismos patogênicos são organismos capazes de causar doenças em seres humanos e animais, sendo encontrados em diversos ambientes, como água, solo, alimentos e superfícies. Entre os principais grupos estão bactérias, vírus, fungos e protozoários, muitos dos quais se disseminam com facilidade por meio de práticas inadequadas de higiene e saneamento básico (MENDOZA *et al.*, 2011). A presença desses microrganismos em ambientes naturais, especialmente em fontes de água, representa uma ameaça à saúde pública, principalmente quando essa água é utilizada para consumo humano ou em processos de produção de alimentos (PANDEY *et al.*, 2014).

As bactérias patogênicas têm se destacado por sua resistência às condições ambientais adversas e por sua capacidade de adquirir genes de virulência, aumentando o potencial de causar infecções (NUNES, 2017). Dentre essas bactérias, destaca-se a *Escherichia coli* (*E. coli*), que, embora faça parte da microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente, possui cepas com potencial patogênico (GWIMBI *et al.*, 2019). A *E. coli* é uma bactéria indicadora de contaminação fecal utilizada em análises microbiológicas de água e alimentos. Embora muitas cepas sejam inofensivas, outras são capazes de produzir toxinas, que estão associadas a quadros clínicos severos, como diarreia sanguinolenta e a síndrome hemolítico-urêmica (CHAPMAN *et al.*, 2006).

A água é um veículo comum de transmissão de microrganismos, especialmente em cenários onde a infraestrutura de saneamento básico é limitada ou inexistente (GWIMBI *et al.*, 2019). Em áreas rurais, é frequente o uso de mananciais em que cada produtor rural adota procedimentos próprios na gestão dos efluentes, muitas vezes sem padronização e conhecimento técnico, podendo resultar na introdução de microrganismos potencialmente patogênicos em ambientes associados ao seu próprio processo produtivo, incluindo aqueles destinados à produção artesanal de alimentos (DIAMANTE, 2023).

De acordo com a Unesco (2024), o Modo de Fazer o Queijo Minas Artesanal representa um patrimônio cultural, histórico e econômico de Minas Gerais. O Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC), produzido por métodos tradicionais e com leite cru, possui certificação de origem e valorização no mercado nacional e internacional. No entanto, a qualidade da água utilizada para higienização dos utensílios, das mãos dos produtores e para a manipulação direta do

queijo é um ponto de vulnerabilidade desta cadeia produtiva, podendo comprometer tanto a segurança do alimento quanto a imagem da produção artesanal brasileira. Assim, este trabalho busca responder à seguinte pergunta: as *E. coli* encontradas nas águas utilizadas na produção do Queijo Minas Artesanal Canastra têm genes de virulência que possam representar risco à segurança do alimento e à saúde pública? Ao trazer essa questão, o estudo apresenta uma contribuição inédita, por ser o primeiro a investigar a patogenicidade de *E. coli* presentes em mananciais da Serra da Canastra, ajudando a ampliar o entendimento e o cuidado sanitário na cadeia produtiva do QMAC.

## **1.2 Justificativa**

Este trabalho está centrado na investigação do potencial patogênico de cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras de água obtidas em 12 mananciais localizados no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra (Parna Canastra), Minas Gerais. Esses mananciais são utilizados como fonte de água por queijarias artesanais dessa região produtora do tradicional QMAC, sendo a qualidade da água utilizada nas etapas de produção um componente essencial para a segurança microbiológica do produto final e para a preservação da saúde dos consumidores. Dessa forma, o presente estudo busca identificar riscos relacionados à presença de *E. coli* com potencial patogênico na água dos mananciais que é utilizada nos processos de produção do Queijo Canastra. Para isso, realizou-se uma triagem molecular de genes relacionados à produção de toxinas nas bactérias portadoras. Os dados gerados neste trabalho podem ser úteis para apoiar políticas públicas de vigilância sanitária, contribuindo para a promoção da segurança alimentar.

Além de proteger a saúde dos consumidores, o presente estudo oferece maior segurança aos produtores artesanais e contribui para a valorização do QMAC. A contaminação por microrganismos patogênicos associada ao uso da água não tratada pode comprometer não apenas a saúde pública, mas também a reputação de produtos tradicionais. A adoção de medidas preventivas baseadas em evidências científicas fortalece a confiança do consumidor e promove a valorização dos produtos regionais no mercado.

## **1.3 Objetivos**

### ***1.3.1 Objetivo geral***

Avaliar se isolados de *Escherichia coli*, obtidos de 12 mananciais que abastecem propriedades rurais produtoras de Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC), localizados no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra, em períodos sazonais (seco e chuvoso), apresentam potencial genético para causar doenças, por meio da detecção de genes de virulência.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Identificar isolados de *E. coli* pertencentes à coleção taxonômica do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG - *Campus* Bambuí com diferentes perfis genéticos, estruturando uma amostra de 80 isolados geneticamente distintos no período seco e 80 no período chuvoso;
- Realizar a triagem molecular (detecção presença/ausência) dos genes de virulência: *stx1* (que codifica a Toxina de Shiga 1); *stx2* (que codifica a Toxina de Shiga 2); *cdt* (que codifica a Toxina Distensora Citoletal); *est1* (que codifica a Enterotoxina termoestável 1); *estA* (que codifica a Enterotoxina termo-lábil);
- Investigar potenciais padrões de distribuição (sazonal e/ou por manancial) dos isolados de *E. coli* portadores de genes de virulência com o objetivo de identificar possíveis causas e pontos de maior risco de contaminação microbiológica.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Serra da canastra

A Serra da Canastra localiza-se no sudoeste do estado de Minas Gerais, sendo formada por um conjunto de serras, abrangendo o Parque Nacional da Serra da Canastra (Parna Canastra). Esta unidade foi criada em 1972 pelo Decreto-Lei n.º 70.355, que, segundo a União Mundial, representa uma estratégia eficaz para garantir o acesso dos nossos descendentes aos bens materiais e espirituais. Além disso, a criação do parque assegura a proteção da nascente histórica do Rio São Francisco, que é o maior rio totalmente brasileiro, com mais de 2.800 km de extensão. Os municípios que fazem parte desse complexo de serra são: São Roque de Minas, Sacramento, Delfinópolis, Vargem Bonita, São João Batista do Glória, Capitólio, entre outros (CÂNDIDO, 2022).

Em razão da relevância histórica, cultural e socioeconômica do Queijo Minas Artesanal da Canastra, diferentes instituições passaram a atuar no reconhecimento e na regulamentação de sua área de produção. Nesse contexto, a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), em articulação com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), por meio da Portaria n.º 1.810, de 24 de abril de 2018 e com a Associação dos Produtores do Queijo Canastra (APROCAN), reconheceu oficialmente a Região do Queijo da Canastra. Essa região compreende oito municípios cadastrados como produtores autênticos do Queijo Minas Artesanal da Canastra (QMAC): Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e São João Batista do Glória, conforme indicado na Figura 1.

Figura 1 - Regiões reconhecida como produtoras do QMAC



Fonte: Adaptada de Dupin (2020).

Legenda: Localização dos 8 municípios reconhecidos como produtores do QMAC, faltando apenas São João Bastista do Glória, localizado entre Vargem Bonita e Delfinópolis .

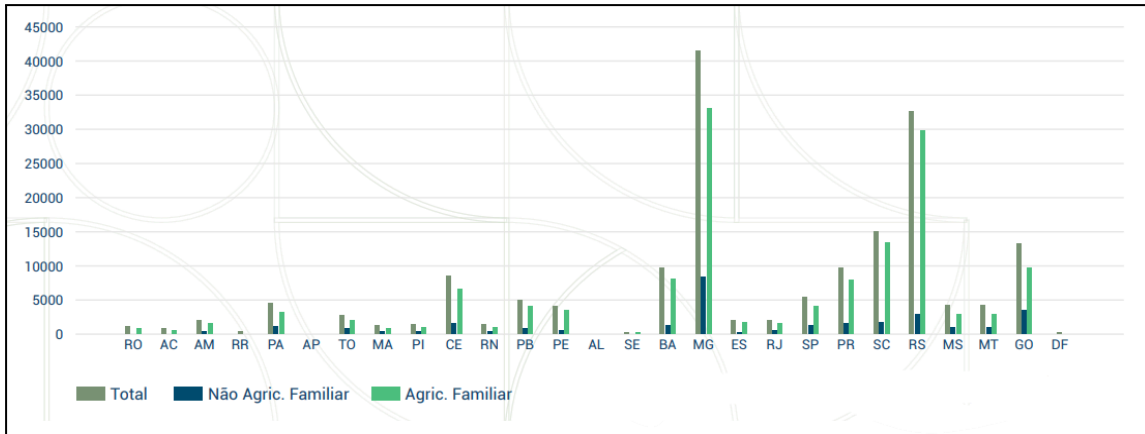
De acordo com Diamante (2023), na Serra da Canastra, a produção de queijo artesanal é majoritariamente realizada por pequenos empreendimentos rurais, tendo a agricultura familiar como principal fonte de renda. A maioria dessas pequenas propriedades pratica a pecuária leiteira em baixa escala para abastecer suas queijarias, que geralmente se localizam na própria fazenda e empregam mão de obra familiar. É comum que grande parte desses empreendimentos rurais utilize as nascentes e os pequenos cursos d'água, formados nas propriedades, como principal fonte de água para todo o empreendimento e consumo residencial.

### 3.1.1 Produção de Queijo

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), obtidos no Censo Agropecuário de 2017, no Brasil existem 175.198 estabelecimentos agroindustriais voltados para a produção de queijo e requeijão, dos quais 143.921 pertencem à agricultura familiar. Entre as Unidades da Federação, Minas Gerais se destaca como o estado com o maior número de estabelecimentos desse setor, contabilizando 41.652 empreendimentos, em sua

maioria de base familiar, conforme apresentado na Figura 2. Além disso, a Figura 3 indica que Minas Gerais também lidera o volume de produção, alcançando 78.219 toneladas anuais de queijo e requeijão, consolidando-se como o principal polo produtor nacional.

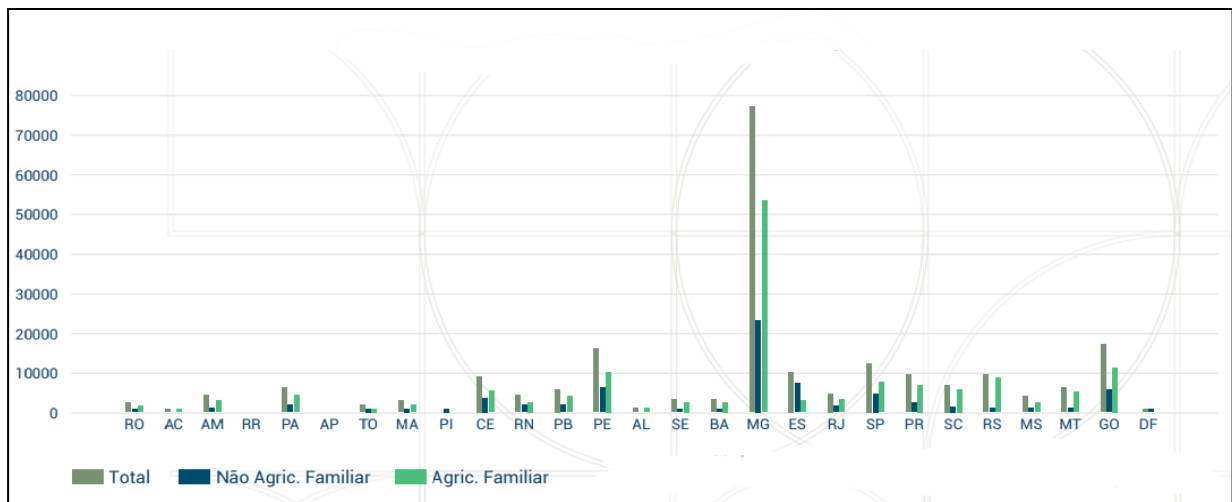
Figura 2 - Agroindústria Rural - N° de estab. - Queijo e requeijão



Fonte: Censo Agropecuário (IBGE, 2017)

Legenda: Número de estabelecimentos com agroindústria rural com produção de queijo e requeijão por unidade da Federação do Brasil

Figura 3 - Agroindústria Rural - Quant. (t) - Queijo e requeijão



Fonte: Censo Agropecuário (IBGE, 2017).

Legenda: Quantidade da produção (em toneladas – t) da agroindústria rural de queijo e requeijão por unidade da Federação do Brasil.

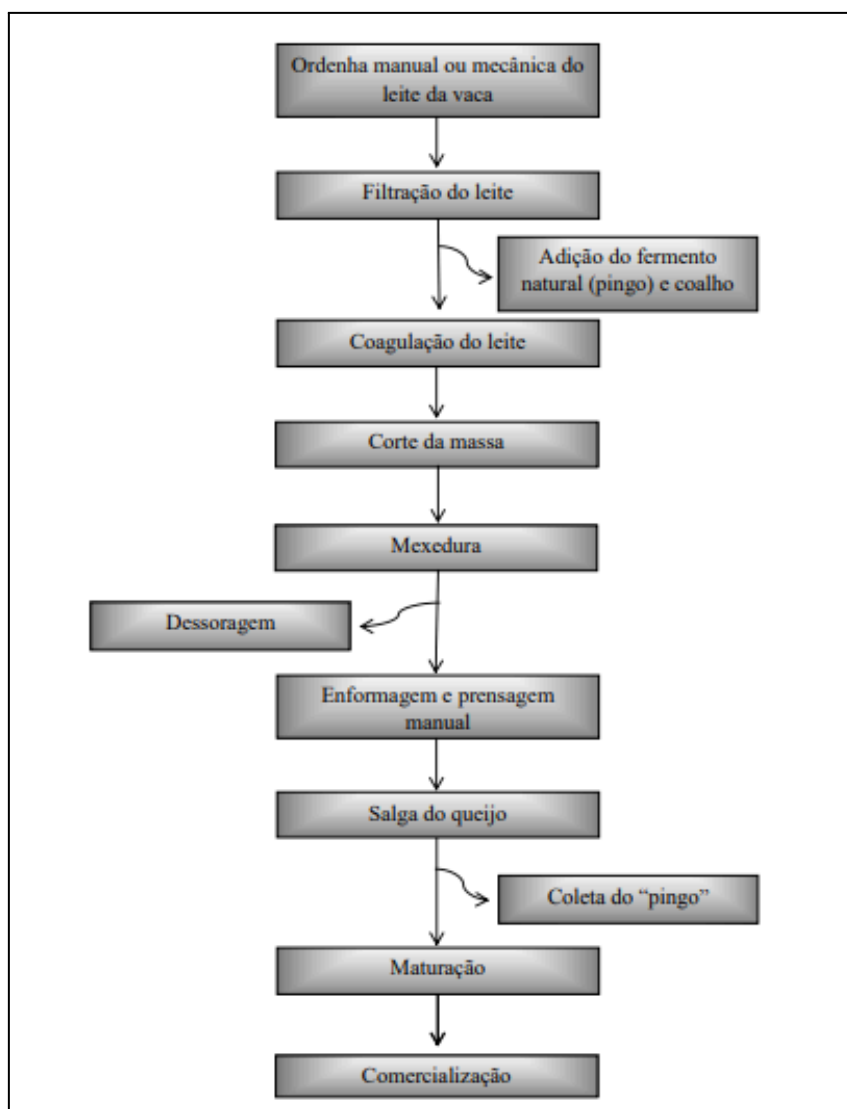
A produção de queijo no Brasil é regulamentada por normas técnicas que estabelecem padrões de identidade e qualidade para garantir a segurança alimentar e a padronização dos produtos. A Portaria MAPA nº 146, de 7 de março de 1996, instituiu os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) para produtos lácteos, incluindo os queijos. Essa portaria define o queijo como o produto fresco ou maturado, obtido pela coagulação do leite por meio de enzimas coagulantes e posterior separação do soro, podendo ainda ser adicionadas substâncias lácteas ou outros ingredientes permitidos. Os regulamentos especificam as classificações de queijo de acordo com os teores de umidade e gordura, estabelecendo, para cada classificação, os critérios microbiológicos a serem atendidos, os aditivos autorizados e os padrões de rotulagem. Essa regulamentação é essencial para assegurar a qualidade dos queijos produzidos no país, seja em escala industrial ou artesanal, e serve de base para as ações de fiscalização e inspeção sanitária realizadas pelos serviços oficiais.

Segundo Santos (2013), o processo de fabricação do Queijo Minas Artesanal da Canastra (QMAC) tem início com a ordenha do leite bovino, que pode ser realizada de forma manual ou mecânica. Antes da ordenha, realiza-se obrigatoriamente a higienização das tetas das vacas, utilizando-se dispositivos contendo solução desinfetante apropriada. Em seguida, procede-se à secagem completa das tetas com papel toalha descartável, garantindo condições higiênico-sanitárias adequadas para a obtenção do leite. Após a ordenha, o leite é filtrado em tecido sintético previamente lavado e desinfetado. Ressalta-se que não há utilização de tratamento térmico, sendo necessário iniciar a fabricação em até 90 minutos após o término da ordenha.

Ao leite são adicionados o coalho e o fermento natural denominado “pingo”, caracterizado como cultura natural. A coagulação ocorre em aproximadamente 40 a 50 minutos, quando se realiza o corte da massa com o auxílio de uma pá. A mexedura é feita em intervalos, favorecendo a dessoragem, que consiste na separação do soro da massa. Em seguida, a massa é enformada em formas revestidas por tecido sintético e prensada manualmente.

Na etapa seguinte, ocorre a salga, durante a qual é coletado o “pingo” que servirá como fermento para a produção do queijo no dia seguinte. A salga é realizada primeiramente em um dos lados do queijo e, após um período de 6 a 12 horas, este é virado para que o procedimento seja repetido no lado oposto. Após 24 horas, o queijo é desenformado e a superfície é raspada levemente com um ralinho, a fim de proporcionar uma casca fina. Por fim, o produto é disposto em prateleiras para maturação, sendo virado diariamente. Dessa forma, o processo produtivo do QMAC compreende as etapas de ordenha, filtração, coagulação, corte da massa, dessoragem, enformagem, prensagem, salga e maturação, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do processo produtivo do Queijo Minas Artesanal.



Fonte: Santos (2013).

Legenda: Fluxograma do processo de fabricação do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra, desde a ordenha até a comercialização.

### 3.1.2 Aspectos Culturais e Riscos Associados à Produção do Queijo Minas Artesanal

A diretora e representante da Unesco no Brasil cita, na matéria “Modos de Fazer o Queijo Minas Artesanal integram Lista do Patrimônio Cultural Imaterial da UNESCO”, em 2024, que:

“Os Modos de Fazer o Queijo Minas Artesanal simbolizam a rica diversidade cultural e os saberes tradicionais do país, que conectam gerações e fortalecem a identidade das comunidades locais. A inclusão de mais um elemento do Brasil na Lista do Patrimônio Cultural Imaterial da UNESCO

representa também um reconhecimento de sua relevância para o desenvolvimento econômico, inclusivo e sustentável.” (MARLOVA JOVCHELOVITCH NOLETO, 2024).

A essência dessa produção está enraizada na história, tradição e cultura local dos produtores, que, por vezes, baseiam suas decisões no conhecimento tradicional. Isso se manifesta, por exemplo, na crença de que a água é pura simplesmente por ter como origem nas nascentes e cursos d'água, o que pode gerar resistência em relação à adoção de medidas de prevenção e controle da qualidade da água consumida (LACERDA *et al.*, 2009).

Essa água é empregada em diversas etapas, desde a pecuária leiteira até o funcionamento da agroindústria de pequeno porte (a queijaria), incluindo a higienização das instalações e equipamentos. Contudo, essa dependência da água da nascente, muitas vezes usada como bebedouro para o gado sem proteção, eleva o risco de contaminação microbiológica da água destinada à produção de leite e queijo, e até para consumo humano, o que representa um desafio para a manutenção dos padrões de qualidade e segurança (DIAMANTE, 2023).

### **3.2 Microrganismo**

Os microrganismos presentes no ambiente aquático constituem um grupo altamente diversificado de seres vivos, desempenhando funções essenciais tanto do ponto de vista ecológico quanto sanitário. Enquanto alguns participam de processos naturais de reciclagem de nutrientes e manutenção do equilíbrio ambiental, outros podem representar sérias ameaças à saúde pública. Quando de origem fecal, esses organismos passam a atuar como contaminantes da água, transformando-se em potenciais causadores de doenças gastrointestinais de veiculação hídrica (GWIMBI *et al.*, 2019).

Grande parte desses microrganismos é constituída por bactérias com potencial patogênico, que têm origem no trato intestinal de animais domésticos ou silvestres que circulam nas proximidades das propriedades rurais. O acesso direto desses animais a reservatórios e nascentes, especialmente quando utilizados como bebedouros sem proteção adequada, favorece a liberação de patógenos no ambiente aquático (DIAMANTE, 2023). Esse processo converte a água em um veículo de transmissão de agentes etiológicos de doenças, ampliando o risco de surtos em comunidades humanas que a utilizam para consumo direto ou em diferentes etapas da produção de alimentos, principalmente os que empregam modos artesanais de produção (GWIMBI *et al.*, 2019).

### 3.2.1 *Microrganismo indicadores de contaminação na produção alimentícia.*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2024), mais de 200 doenças são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, que podem estar presentes nos alimentos desde a sua origem, em decorrência de contaminação ambiental, incluindo a poluição da água, do solo, do ar ou serem introduzidos em diferentes etapas da cadeia produtiva, em razão de práticas inadequadas de armazenamento, manipulação, processamento e transporte dos alimentos. Segundo Silva e outros, (2020), os microrganismos patogênicos são responsáveis por diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e suas consequências clínicas variam desde quadros gastrointestinais leves até infecções mais graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos.

A presença potencial de microrganismos patogênicos nos rios que abastecem as queijarias representa um risco à segurança do alimento, já que a água utilizada na produção pode atuar como veículo de contaminação. Nesse contexto, a legislação brasileira, por meio da Portaria MAPA nº 146, de 7 de março de 1996, estabelece o Regulamento Técnico Geral para a fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo, seguindo as recomendações da *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF). Essa referência internacional estabelece categorias de alimentos e critérios para interpretação de resultados microbiológicos, permitindo padronizar a avaliação da qualidade sanitária e do risco de contaminação em queijos, bem como definir os padrões microbiológicos que devem ser atendidos.

As definições de classificação dos queijos apresentadas na legislação consideram o conteúdo de umidade da massa, além de outras características próprias e tecnologias de fabricação. Entretanto, não existe uma definição precisa para o QMAC, que é uma diversificação do Queijo Minas Artesanal (QMA). Para tal, seria necessário um padrão técnico específico que estabelecesse seu teor de umidade e de matéria gorda.

De acordo com o processo de fabricação descrito por Santos (2013), apresentado na seção

3.1.1, conclui-se que o QMAC se enquadraria nas seguintes categorias:

- Queijos de média umidade (umidade entre 36,0% e 45,9%);
- Ou, dependendo do grau de dessoragem e tempo de maturação, poderia se aproximar da categoria de Queijos de baixa umidade (umidade até 35,9%).

As Tabelas 1 e 2 apresentam os limites microbiológicos de coliformes estabelecidos pela legislação brasileira para essas diferentes condições de queijos.

Tabela 1 - Queijos de baixa umidade (umidade menor que 36%)

Microorganismos	Critérios de Aceitação	Categoria ICMSF
Coliforme/grama (30°C)	$n^*=5$ $c^{**}=2$ $m^{***}=200$ UFC/g $M^{****}=1.000$ UFC/g	5
Coliforme/grama (45°C)	$n=5$ $c=2$ $m=100$ $M=500$	5

$n^*$  = número de unidades amostrais;  $c^{**}$  = número máximo de unidades amostrais que podem apresentar resultados entre  $m$  e  $M$ ;  $m^{***}$  = valor microbiológico aceitável;  $M^{****}$  = valor microbiológico máximo permitido.

Fonte: Adaptado de Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico Geral para a fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo.

Legenda: Critérios microbiológicos para queijos de baixa umidade (umidade <36%), indicando limites aceitáveis e máximos de coliformes totais e termotolerantes, segundo o ICMSF.  $n$  = número de unidades amostrais;  $c$  = número máximo de unidades amostrais com resultados entre  $m$  e  $M$ ;  $m$  = valor microbiológico aceitável;  $M$  = valor microbiológico máximo permitido.

Tabela 2 - Queijos de média umidade (36% &lt; umidade &lt; 46%).

Microorganismos	Critérios de Aceitação	Categoria ICMSF
Coliforme/grama (30°C)	$n=5$ $c=2$ $m=1.000$ UFC/g $M=5.000$ UFC/g	5
Coliforme/grama (45°C)	$n=5$ $c=2$ $m=100$ UFC/g $M=500$ UFC/g	5

Fonte: Adaptado de Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico Geral para a fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo.

Legenda: Critérios microbiológicos para queijos de média umidade (36% < umidade < 46%), indicando limites aceitáveis e máximos de coliformes totais e termotolerantes, segundo o ICMSF.  $n$  = número de unidades amostrais;  $c$  = número máximo de unidades amostrais com resultados entre  $m$  e  $M$ ;  $m$  = valor microbiológico aceitável;  $M$  = valor microbiológico máximo permitido.

Embora esses parâmetros sejam fundamentais para garantir a qualidade sanitária do produto, é importante destacar que eles não contemplam a presença de fatores de virulência, os quais podem estar associados a cepas específicas de microrganismos. Nesse contexto, a *Escherichia coli*, bactéria com potencial patogênico classificada como coliforme, pode apresentar cepas portadoras de genes de virulência, mesmo quando detectada em quantidades dentro dos limites permitidos por lei, representando risco para o consumidor final.

### **3.2.2 Bactérias patogênicas**

O principal grupo envolvido em surtos alimentares é constituído por bactérias patogênicas (OLIVEIRA, 2010), já que diversos fatores influenciam na sua proliferação conforme apresentado no tópico 3.2, incluindo o descongelamento inadequado, preparação com excessiva antecipação, alimentos mantidos à temperatura ambiente, condições que favorecem a proliferação desses microrganismos.

Além da facilidade de proliferação em condições inadequadas de manipulação e armazenamento, as bactérias patogênicas podem causar uma variedade de danos à saúde humana, que vão desde gastroenterites leves até infecções graves, dependendo da espécie, da carga microbiana ingerida e da suscetibilidade do consumidor. Esses microrganismos produzem toxinas ou desencadeiam processos infecciosos que resultam em sintomas como diarreia, náuseas, vômitos, febre e dores abdominais, podendo evoluir para quadros mais severos, como desidratação intensa, septicemia ou complicações neurológicas, especialmente em grupos vulneráveis, como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (OLIVEIRA, 2010; SEIXAS, 2020).

Para Gonçalves (2002), alguns gêneros de bactérias patogênicas apresentam grande relevância em contextos sanitários e epidemiológicos. Entre eles, destacam-se *Escherichia* e *Enterobacter*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e classificados como coliformes devido à capacidade de fermentar açúcares, resultando na produção de ácidos orgânicos, etanol, dióxido de carbono e hidrogênio. Por outro lado, os gêneros *Salmonella* e *Shigella*, embora não sejam considerados coliformes, também integram essa família e compartilham diversas características morfológicas e bioquímicas típicas das enterobactérias, o que reforça sua importância no diagnóstico e na vigilância de doenças transmitidas por alimentos.

### **3.2.3 Água como veículo de transmissão e avaliação microbiológica na produção de alimentos**

A água é amplamente utilizada na indústria de alimentos em processos como lavagem de matérias-primas, higienização de equipamentos, manipulação, preparo e até mesmo como ingrediente na formulação de produtos. Entretanto, quando apresenta qualidade microbiológica insatisfatória, torna-se um importante veículo de transmissão de microrganismos (SILVA *et al.* 2010).

As bactérias patogênicas são as principais responsáveis por surtos alimentares e, em grande parte, também estão associadas a microrganismos indicadores de contaminação da água,

como os coliformes totais, coliformes termotolerantes e enterococos. De acordo com Silva e outros (2010), esses indicadores não são necessariamente patogênicos; entretanto, sua presença evidencia falhas no tratamento e na distribuição da água, além de indicar o risco de ocorrência de cepas com potencial patogênico.

Na produção de alimentos, a utilização de água contaminada pode comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos produtos, elevando o risco de DTA e resultando em prejuízos econômicos, rejeição pelo consumidor e infrações às normas de segurança alimentar. Por isso, a legislação brasileira, como a Portaria GM/MS nº 888/2021, define os padrões de potabilidade da água. De acordo com o Anexo I desta portaria, o padrão bacteriológico da água destinada ao consumo humano baseia-se na ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal, como *E. coli* (que deve estar ausente em 100 mL de amostra de água), além de parâmetros que indicam a eficiência do tratamento, como as contagens toleradas de coliformes totais.

### **3.2.4 Genes de virulência**

Para determinar se um microrganismo indicador de contaminação possui potencial patogênico, é essencial que ele possua genes de virulência, que correspondem a segmentos do material genético que codificam fatores responsáveis por aumentar sua capacidade de colonizar o hospedeiro, evadir ou modular a resposta imune e causar danos aos tecidos. Em outras palavras, são determinantes moleculares que diferenciam cepas patogênicas de cepas comensais ou ambientais (OCHMAN, 2001).

De acordo com Abdulateef e colaboradores (2023), um gene de virulência pode ser classificado em quatro grupos principais: (1) fatores de adesão: permitem que a bactéria se fixe às células hospedeiras ou à matriz extracelular, favorecendo a colonização. Podem ser proteínas, como pili e fimbrias, ou componentes não proteicos, como lipopolissacarídeos e cápsulas; (2) fatores de invasão: permitem a entrada e multiplicação dentro das células hospedeiras, incluindo proteínas efectoras, sistemas de secreção e estruturas como flagelos que auxiliam a motilidade; (3) fatores de toxinas: causam danos aos tecidos do hospedeiro e contribuem para a doença. Podem ser endotoxinas, como lipopolissacarídeos (LPS), ou exotoxinas, incluindo citotoxinas, superantígenos e toxinas de membrana; (4) fatores de evasão imunológica: permitem que as bactérias evitem ou neutralizem as defesas imunológicas do hospedeiro.

### **3.3 *Escherichia coli***

A *Escherichia coli* é uma espécie bacteriana de grande importância, tanto como ferramenta de biotecnologia, atuando como hospedeira para manipulações de DNA recombinante, quanto como um dos patógenos transmitidos por alimentos mais conhecidos. Embora nem todas as suas cepas causem doenças, sua presença é frequentemente utilizada como um indicador de potencial contaminação fecal (BATT, 2014; SILVA *et al.*, 2012)

#### **3.3.1. Descrição geral do grupo**

A capacidade de algumas cepas de *Escherichia coli* em causar doenças foi reconhecida já no início do século XX, sendo a diarreia infantil uma das primeiras enfermidades atribuídas a esse microrganismo, que também pode habitar normalmente o intestino de diversos animais de sangue quente (BATT, 2014). Além do trato intestinal, *E. coli* pode ser isolada em diferentes ambientes, como solos e plantas (MADIGAN *et al.*, 2010), e ainda está presente em produtos como iogurtes, cervejas, queijos, entre outros, nos quais é considerada um indicador de contaminação, devido ao seu potencial risco sanitário para o consumidor final (MARTINS; REIS, 2012; TORTORA *et al.*, 2010).

Trata-se de um bastonete Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, que faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes, sendo considerado o seu principal representante (SILVA *et al.*, 2010). Além disso, *E. coli* é caracterizada por ser oxidase-negativo e capaz de crescer utilizando fontes simples de carbono, como glicose e acetato, fermentando hexoses para produzir uma mistura de ácidos e dióxido de carbono (BATT, 2014). Sua mobilidade é conferida por flagelos, que também desempenham papel importante em sua classificação (ORSKOV, 1977).

#### **3.3.2. *E. coli* como agente de Foodborne diseases**

A ingestão de alimentos contaminados com cepas patogênicas de *Escherichia coli* pode desencadear diferentes formas de DTA (BATT, 2014). Essas cepas são classificadas em distintas categorias patogênicas, cada uma com padrões próprios de doença e fatores de virulência (MADIGAN *et al.*, 2010). Os fatores de virulência são componentes essenciais que permitem às bactérias estabelecer infecções, superar as defesas do hospedeiro e causar doenças (ABDULATEEF *et al.*, 2023).

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC), por exemplo, está frequentemente associada à diarreia infantil, pois adere às células da mucosa intestinal, provocando lesões e diarreia mesmo sem a produção de enterotoxinas. Já a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causa quadros graves ao invadir a parede intestinal e disseminar-se entre as células, de maneira semelhante à *Shigella*, levando a processos inflamatórios intensos (MADIGAN *et al.*, 2010).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), por sua vez, é uma das principais responsáveis pela chamada “diarreia do viajante”, afetando especialmente jovens e idosos. Sua patogenicidade está associada à produção de enterotoxinas termoestáveis e termolábeis, que desencadeiam diarreia aquosa, geralmente sem febre (MADIGAN *et al.*, 2010; BATT, 2014). Em contraste, a *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) representa uma das formas mais graves de infecção, podendo evoluir para colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), quadro marcado por anemia hemolítica, trombocitopenia (redução do número de plaquetas) e insuficiência renal aguda, com risco de sequelas permanentes ou até morte. Outro grupo relevante é a *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), caracterizada pela adesão às células e associação com episódios de diarreia aguda e persistente (BATT, 2014).

Outros patotipos também apresentam relevância clínica e epidemiológica. A *E. coli* difusamente aderente (DAEC) adere de forma difusa às células intestinais, estando associada à diarreia em crianças pequenas. A *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) é capaz de aderir e invadir células intestinais, sobrevivendo em macrófagos, e tem sido relacionada a doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Crohn (doença inflamatória crônica que pode afetar qualquer parte do intestino). A *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é responsável por infecções fora do intestino, incluindo infecções urinárias, meningite e septicemia (infecção na corrente sanguínea). Já a *E. coli* necrotóxica (NTEC) produz toxinas que provocam necrose celular, podendo causar quadros de diarreia grave (CHAPMAN, T. A. *et al.*, 2006; BATT, 2014; PAKBIN *et al.*, 2021).

Os surtos de doenças transmitidas por *E. coli* são documentados desde a década de 1940, sendo a cepa O157:H7 uma das mais frequentemente. Alimentos como carne moída, água, saladas de vegetais e cidra de maçã já estiveram associados a casos relevantes (BATT, 2014). Em outubro de 2024, a *Food and Drug Administration* (FDA) e o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) identificaram um surto de *E. coli* O157:H7 vinculado ao consumo de cebolas fatiadas utilizadas em hambúrgueres *Quarter Pounder* do *McDonald's*, o que levou a um recall voluntário de lotes de cebolas amarelas pela empresa *Taylor Farms* (FDA, 2024).

### 3.3.3. Genes de virulência em *E. coli*

Os fatores de virulência, descritos no tópico 3.2.4, são essenciais para a capacidade bacteriana de causar doenças, e sua presença pode afetar a gravidade e a progressão da infecção (ABDULATEEF *et al.*, 2023). Esses fatores são codificados por genes, frequentemente organizados em operons e regulados por fatores transcricionais responsivos a sinais ambientais, ou seja, o microrganismo pode apresentar potencial patogênico sem expressá-lo continuamente (OCHMAN, 2001).

O ANEXO A apresenta os principais genes de virulência dos patótipos entéricos de *Escherichia coli*, organizados em quatro categorias funcionais: Colonização que se refere a genes que permitem à bactéria aderir e se fixar às células intestinais; Aptidão ou *fitness* que engloba genes que favorecem a sobrevivência e a competição no ambiente intestinal; Toxinas capazes de danificar células do hospedeiro; e Efetores, que incluem genes que produzem proteínas secretadas capazes de manipular respostas celulares do hospedeiro. Essa organização facilita a compreensão de como diferentes combinações de genes contribuem para os padrões de doença observados em cada patótipo.

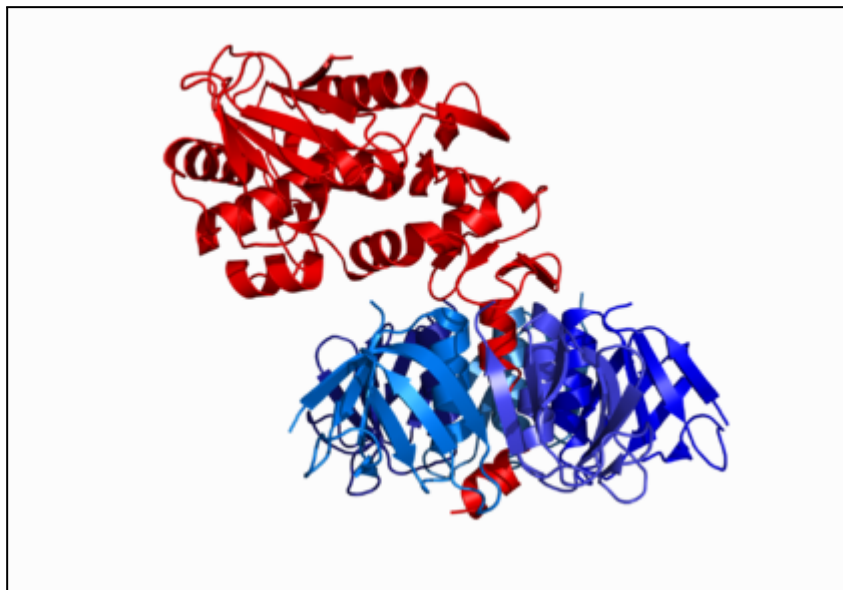
No estudo, foram analisados genes de relevância clínica e epidemiológica, incluindo a Toxina Shiga 1 e 2 (*stx1* e *stx2*), responsáveis por severas manifestações clínicas associadas à *E. coli* produtora de Shiga toxina; a Toxina *Distensora Citoletal* (*cdt*), que interfere no ciclo celular e promove distensão e morte celular; a Enterotoxina termoestável 1 (*est1*), associada à diarreia aquosa; e a Enterotoxina termo-lábil (*eltA*), cuja ação está relacionada à secreção de fluidos intestinais. Esses genes foram selecionados por sua importância na caracterização do potencial patogênico das cepas avaliadas.

#### 3.3.3.1 Toxina *Shiga* 1

A Toxina *Shiga* 1, codificada pelo gene *stx1*, também chamada de verotoxina ou toxina *Shiga-like*, é uma toxina produzida por algumas cepas de *E. coli*, conhecidas como enterohemorrágicas (EHEC) ou *shigatoxigênicas* (STEC). Essa toxina é muito semelhante àquela produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo 1 (RIGOBELLO *et al.*, 2006; MELO, 2006; BATT, 2014).

A proteína Stx1 é formada por uma parte maior, chamada subunidade A, representada em vermelho na Figura 5, responsável pelo o efeito tóxico, e por cinco partes menores, denominadas subunidades B representada em azul na Figura 5, que auxiliam na ligação da toxina às células dos rins, plaquetas e glóbulos vermelhos. Após a entrada da toxina na célula, a subunidade A é ativada e provoca os danos característicos da infecção (BATT, 2014; PAKBIN *et al.*, 2021).

Figura 5 - Toxina Shiga



Fonte: USP (2025) apud Wikipedia

Legenda: Representação estrutural da toxina Shiga, evidenciando em vermelho a subunidade A e em azul a subunidade B.

### 3.3.3.2 Toxina Shiga 2

A toxina Shiga 2 codificada pelo gene *stx2*, também conhecida como verotoxina ou toxina Shiga-like II, é produzida por determinadas cepas de *Escherichia coli*, as quais são classificadas, assim como as que produzem a toxina proteica Stx1, como enterohemorrágicas (EHEC) ou produtoras de toxina *Shiga* (STEC) (PATON & PATON, 1998; NATARO & KAPER, 1998).

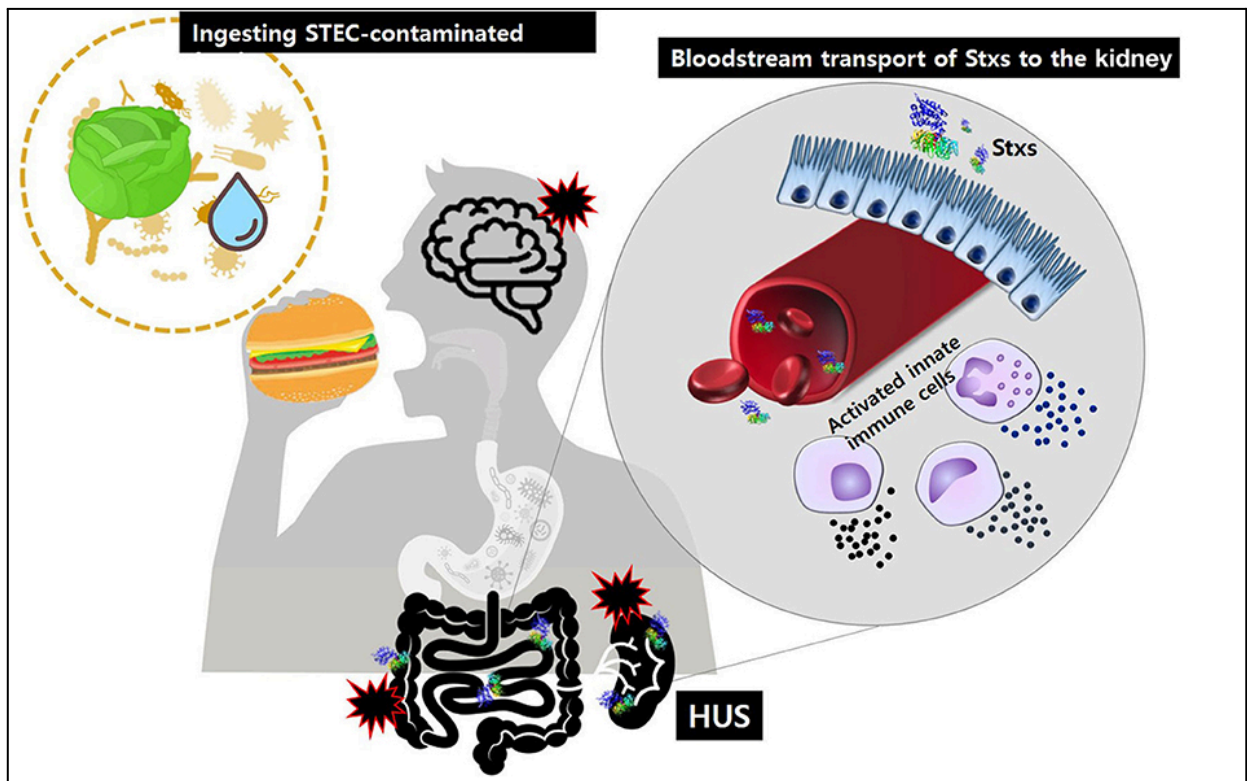
A estrutura da proteína Stx2 é muito semelhante à da Stx1: possui uma subunidade A, responsável pela atividade tóxica, e cinco subunidades B, que ajudam a toxina a se ligar a receptores específicos nas células humanas, como às células dos rins, plaquetas e glóbulos vermelhos. Após essa ligação, a subunidade A é internalizada e passa a exercer sua ação tóxica, resultando em danos celulares característicos (BATT, 2014; PAKBIN *et al.*, 2021).

A Stx2 está fortemente associada a quadros graves em humanos, como diarreia sanguinolenta, Colite Hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), podendo levar à insuficiência renal. Cepas que produzem apenas Stx2 estão mais ligadas a complicações severas do que aquelas que produzem apenas Stx1, em parte porque o gene *stx2* tende a ser mais ativamente expresso durante a infecção. Além disso, a dose infecciosa é muito baixa: menos de 100 bactérias podem causar quadros graves de doença (RIGOBELLO *et al.*, 2006; BATT, 2014; PAKBIN *et al.*, 2021).

#### 3.3.3.2.1 Mecanismo de ação das toxinas Shiga (Stxs)

Segundo Kim *et. al* (2020), os surtos de STEC estão frequentemente associados a reservatórios animais e ao consumo de alimentos contaminados, as toxinas *Shiga* (Stxs) podem atravessar a barreira intestinal por dois caminhos: pela captação e transcitose em células M ou pelo transporte paracelular. Ao alcançar a submucosa, essas toxinas ativam células da imunidade inata, como neutrófilos e monócitos, que passam a atuar como “veículos” para levá-las à corrente sanguínea. Além disso, a ativação dessas células estimula a produção local de citocinas pró-inflamatórias, intensificando a lesão nos tecidos. Finalmente, as toxinas alcançam as células endoteliais glomerulares e as células epiteliais tubulares renais, ambas com alta densidade do receptor Gb3. Esse processo causa danos renais, o principal alvo da toxina, e pode evoluir para a síndrome hemolítico-urêmica SHU associada à diarreia.

Figura 6 - Mecanismo de ação das toxinas Shiga (Stxs) em infecções por STEC



Fonte: KIM *et al.*, 2020.

Legenda: As toxinas atravessam a barreira intestinal, alcançam a corrente sanguínea e atingem os rins, principal órgão-alvo associado à síndrome hemolítico-urêmica.

### 3.3.3.3 Toxina Distensora Citoletal

A Toxina Distensora Citoletal (CDT) é codificada por um operon constituído por três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), cujos produtos estão envolvidos na interrupção do ciclo celular eucariótico. Os polipeptídeos CdtA, CdtB e CdtC associam-se para formar um complexo proteico funcional responsável pela atividade da toxina CDT. As subunidades CdtA e CdtC participam da ligação da toxina à superfície da célula eucariótica, facilitando a internalização da subunidade CdtB, que é translocada ao núcleo celular, onde induz quebras de fita dupla no DNA. Esse dano genotóxico compromete a integridade do epitélio intestinal, reduzindo a capacidade de absorção de água e nutrientes e favorecendo a ocorrência de fezes mais líquidas (SHIMA *et al.*, 2012).

Esta toxina foi identificada a primeira vez em *Escherichia coli* em 1987 e é encontrada em diversos patótipos de *E. coli* (EPEC, ExPEC, NTEC, EHEC) e outras bactérias Gram-negativas, como a *Shigella dysenteriae*, e possui pelo menos cinco variantes descritas em *E. coli* (Eccdt-I a V) (SHIMA *et al.*, 2012; CHAPMAN, T. A. *et al.*, 2006).

#### 3.3.3.4 Enterotoxina termoestável 1

Enterotoxina termoestável 1 possui um mecanismo que faz com que o intestino libere mais água e sais do que deveria, causando diarreia. Esta enterotoxina é codificada pelo gene *estI* e foi inicialmente identificada em cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), que produzem uma enterotoxina termoestável de baixo peso molecular, detectada em modelos intestinais *in vitro* (SAVARINO *et al.*, 1991).

O gene *estI* não está restrito ao grupo EAggEC, ele foi detectado em diversas categorias de *E. coli* diarreicas (EHEC, EPEC, ETEC, entre outras) e até em algumas linhagens de *Salmonella*, o que indica uma ampla distribuição entre enterobactérias. Em muitos isolados, este gene encontra-se localizado em plasmídeos conjugativos, o que explica sua disseminação entre diferentes linhagens de *E. coli*. (PAIVA DE SOUSA & DUBREUIL, 2001).

Estudos de detecção molecular demonstraram a existência de variantes do *estI* (incluindo formas deletadas ou com substituições de nucleotídeos), que nem todas as variantes codificam uma proteína funcional; por tanto, a detecção do gene por PCR nem sempre implica expressão funcional da enterotoxina (SILVA *et al.*, 2014).

#### 3.3.3.5 Enterotoxina termo-lábil

A toxina termolábil (LT-A), produzida por algumas cepas enterotoxigênicas de *E. coli* (ETEC), atua interferindo no funcionamento normal das células intestinais. Quando a LT-A entra em contato com o intestino, sua porção ativa estimula de forma exacerbada sistemas intracelulares que controlam a liberação de água e sais. Essa ativação aumenta o número de mensageiros químicos dentro da célula, fazendo com que ela passe a liberar grandes quantidades de íons, especialmente cloro, junto com água, para o interior do intestino. Como o organismo não consegue reabsorver todo esse líquido, ocorre um acúmulo de água no lúmen intestinal, resultando em diarreia aquosa (SHEIKH *et al.*, 2022).

Segundo Rodrigues e colaboradores (2011), existem diferentes versões da toxina LT. Essas variantes podem ter níveis diferentes de atividade enzimática e de ativação do sistema imune, isso indica que mudanças genéticas no gene *eltA* (responsável por produzir a LT-A) podem influenciar o quanto a bactéria é capaz de causar doença e, como o corpo reage a ela.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitar a compreensão das etapas metodológicas adotadas neste estudo, foi organizado um fluxograma, apresentado a seguir (Figura 7), contendo a sequência das atividades realizadas. A Figura 7 resume o percurso metodológico desde a coleta das amostras até as análises laboratoriais e interpretação dos resultados, permitindo visualizar de forma clara e objetiva todas as fases do processo.

Figura 7 - Fluxograma contendo a sequência das atividades realizadas



Fonte: Autora, (2026)

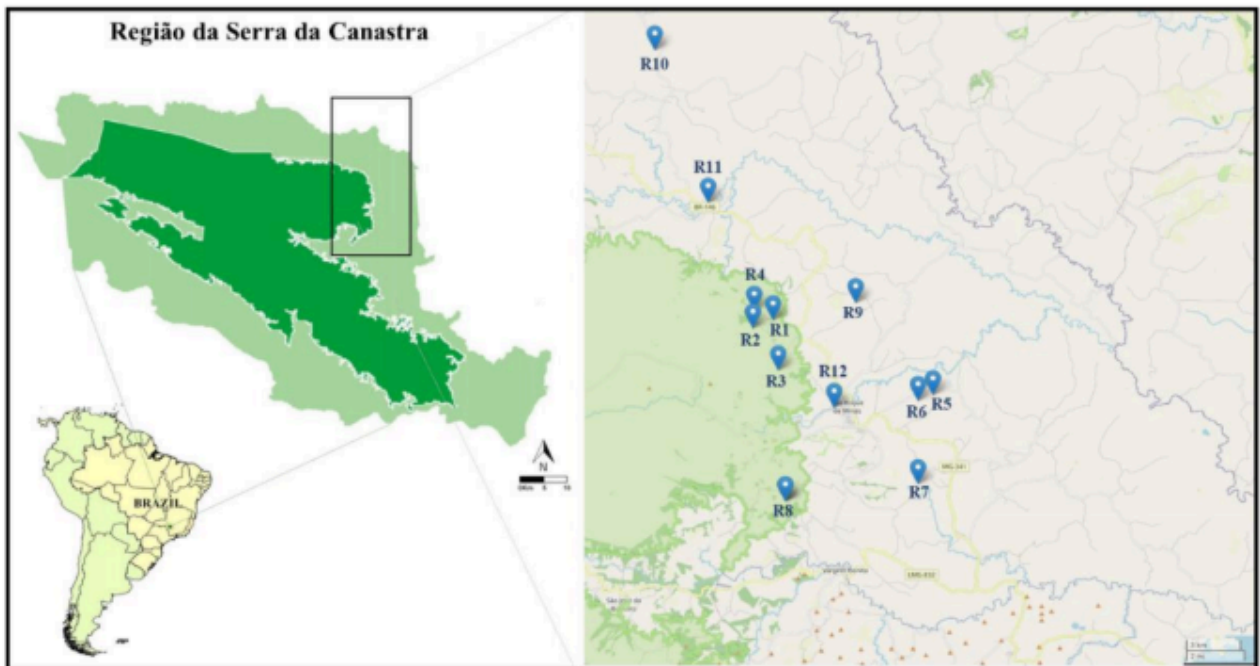
Legenda: O fluxograma demonstra o percurso metodológico seguido na pesquisa, indicando cada fase do trabalho, desde os procedimentos iniciais até a etapa final de análise dos dados.

#### 4.1 Contextualização e origem das amostras

O presente trabalho foi realizado a partir de uma amostra delineada com base na coleção taxonômica de microrganismos do banco de isolados de *E. coli* do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG - *Campus* Bambuí. Este banco de isolados de *E. coli* foi constituído a partir de amostras de água coletadas por Leôncio Jânio Silva Diamante, no âmbito do projeto de mestrado intitulado "IMPACTO DA PRODUÇÃO ARTESANAL DE QUEIJOS EM MANANCIAS DA SERRA DA CANASTRA" desenvolvido 2023, dissertação apresentada no Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí. As coletas de água foram realizadas em diferentes pontos de mananciais da Serra da Canastra, utilizados por produtores de QMAC em seu ambiente de produção de leite e para abastecimento da queijaria. A área de estudo definida por Diamante (2023) compreende uma localidade situada nas proximidades do Parque Nacional da Serra da Canastra, inserida dentro da microrregião produtora do Queijo Minas Artesanal Canastra, conforme estabelecido pela Portaria IMA nº 694/2004. Essa região se destaca pela presença predominante de agroecossistemas familiares, nos quais a produção do Queijo Canastra representa uma das principais atividades econômicas.

No delineamento experimental, foram selecionados 12 rios de pequeno porte (nomeados como R1 a R12), que são utilizados como fontes de abastecimento de água para os empreendimentos rurais e as agroindústrias queijeiras. Em cada um desses rios, foram definidos pontos específicos de captação, totalizando 13 empreendimentos acessados. A Figura 8 apresenta a localização geográfica dos rios, ilustrando a distribuição espacial da área investigada. As campanhas de coleta ocorreram em duas estações, sempre que possível, no mesmo ponto amostral. A Estação Seca com coletas realizadas nos meses de julho e agosto de 2022, dividida em três expedições semanais. Já a campanha referente à Estação Úmida foi realizada em março de 2023, também em três expedições semanais.

Figura 8 - Pontos de Coleta



Fonte: Diamante, (2023).

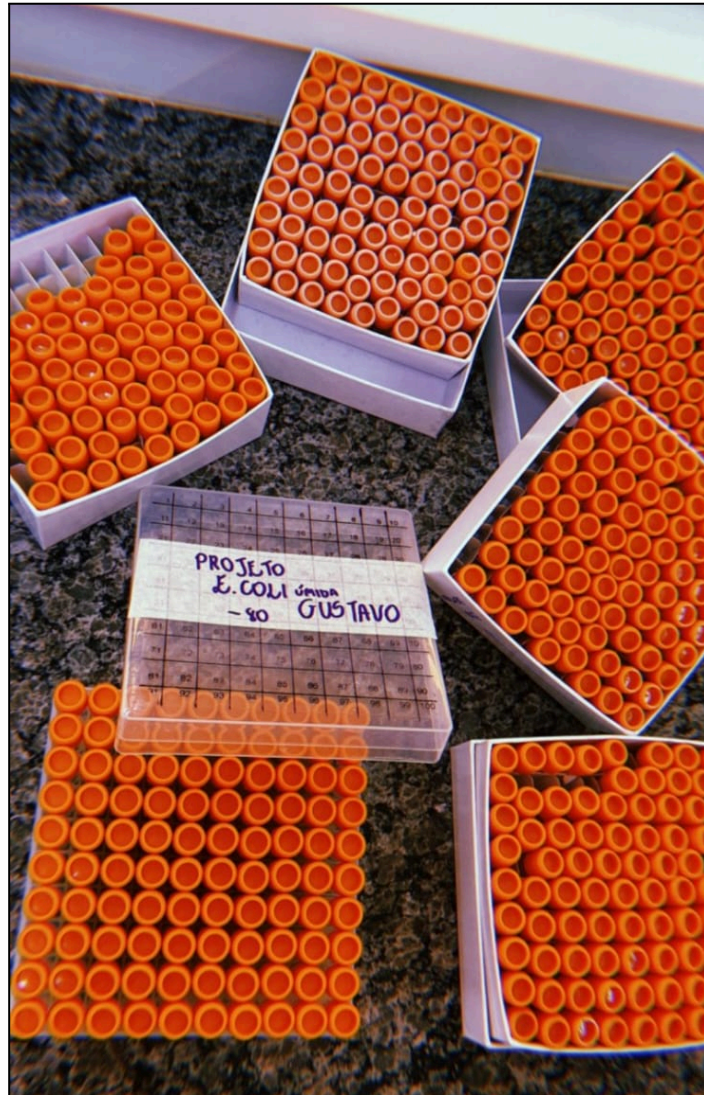
Legenda: Representação dos 12 pontos de coleta das amostras.

O isolamento de cepas de *Escherichia coli* foi realizado por meio do plaqueamento de amostras de água previamente concentradas. Para cada ponto de coleta, 150 mL de água foram concentrados em 1 mL de solução salina estéril, a partir do qual se procedeu ao plaqueamento em meio cromogênico seletivo com indicador simultâneo para coliformes totais, o Ágar Chromocult Coliformes (Merck), conforme as instruções do fabricante. Após o crescimento bacteriano, foram contabilizadas as colônias formadas nas várias categorias de cor. Consideraram-se como *Escherichia coli* aquelas que apresentavam coloração azul-escuro, conforme as instruções do fabricante do meio de cultura utilizado. A seleção das colônias por ponto de coleta foi realizada sempre que houve crescimento microbiano e quando tecnicamente viável.

Posteriormente, procedeu-se à técnica de estrias de esgotamento em meio de cultura Ágar MacConkey (Merck, Alemanha), seletivo para bactérias Gram-negativas. Nesse meio, colônias de *Escherichia coli* apresentam coloração rosa, em função da fermentação da lactose, enquanto outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras formam colônias incolores ou esbranquiçadas. A identificação presuntiva foi complementada pela coloração de Gram, técnica diferencial baseada na composição da parede celular bacteriana, sendo selecionados apenas isolados caracterizados como bacilos Gram-negativos, compatíveis com o perfil presuntivo de *E. coli* (TORTORA *et al.*, 2010). Na sequência, as culturas confirmadas foram transferidas para caldo BHI (*Brain Heart*

*Infusion Broth*) e mantidas em incubação por 18 a 24 horas, a 37 °C, sob aerobiose. Em seguida, as amostras foram preparadas para criopreservação em duplicata, utilizando criotubos de 2 mL, e foram distribuídos 700 µL de inóculo do cultivo e 300 µL de glicerol 80% (v/v), para o congelamento em -80°C para uso posterior (Figura 9).

Figura 9 - Criotubos contendo isolados de *Escherichia coli* preparados para armazenamento



Fonte: Autora (2026)

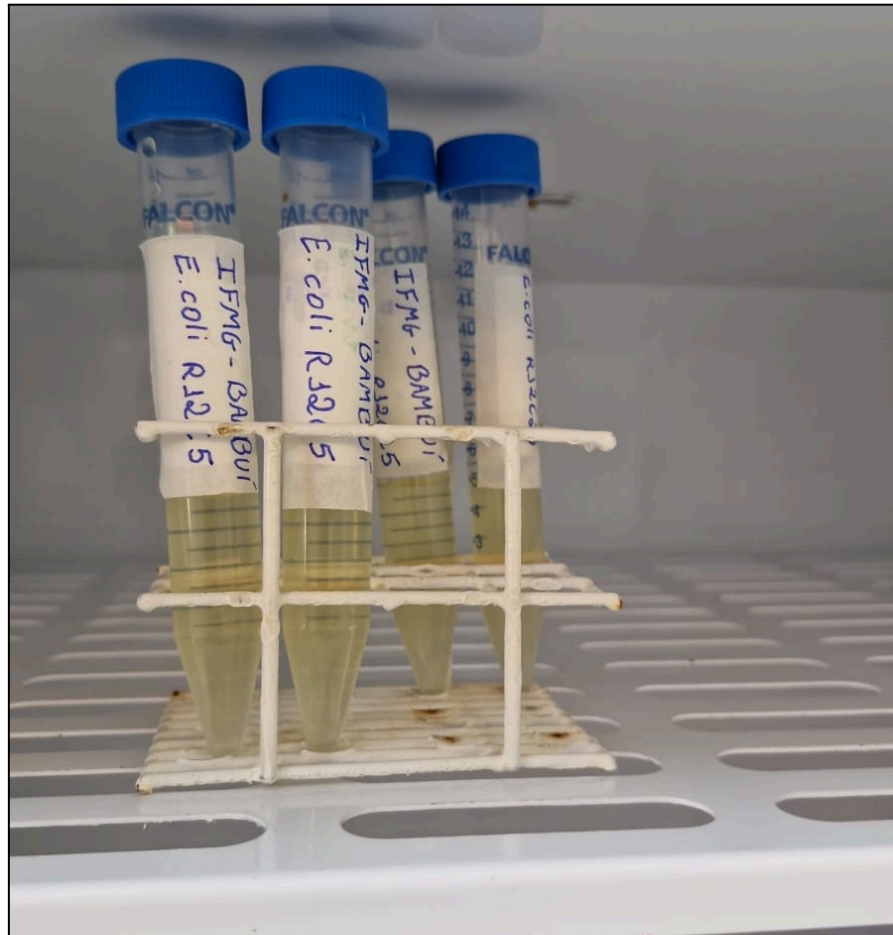
Legenda: Criotubos de 2 mL com os isolados de *E. coli* preparados para congelamento em duplicata.

#### 4.2 Extração de DNA

Para verificar quais isolados apresentavam perfis genéticos distintos, realizou-se inicialmente a extração do DNA genômico total bacteriano, utilizando um protocolo adaptado à base de precipitação com NaCl, conforme descrito por Miller e colaboradores, (1988). As

amostras previamente armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram reativadas em quadruplicata, sendo cada uma inoculada com  $100\text{ }\mu\text{L}$  da cultura descongelada em  $5\text{ mL}$  de caldo BHI. Em seguida, os tubos foram incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas, até atingir crescimento adequado (Figura 10). Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a  $3.000\text{ rpm}$ . Logo após, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com  $1\text{ mL}$  de água Milli-Q, sendo homogeneizado com ponteira. As quatro alíquotas da mesma amostra foram reunidas em um único tubo Falcon de  $15\text{ mL}$  e submetidas a nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet lavado com  $1\text{ mL}$  de água Milli-Q. Após a nova homogeneização,  $1\text{ mL}$  da suspensão foi transferido para um microtubo de  $1,5\text{ mL}$  e centrifugado por 15 minutos a  $3.000\text{ rpm}$ . O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em  $450\text{ }\mu\text{L}$  do tampão de lise, preparado com  $0,32\text{ M}$  de sacarose;  $5\text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $10\text{ mM}$  de Tris-HCl pH 7,5 e  $1\%$  de Triton X-100. Esse tampão foi utilizado para promover a lise celular por meio da combinação entre a alta concentração de sacarose (que mantém a integridade osmótica inicial), o detergente não iônico Triton X-100 (que rompe a membrana plasmática), os íons  $\text{Mg}^{2+}$  e o Tris, que, em conjunto, contribuem para estabilizar o ambiente químico durante o processo de liberação do conteúdo intracelular. Foi adicionado  $2\text{ }\mu\text{L}$  de Proteinase K ( $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ ), para degradar proteínas celulares e inativar nucleases, favorecendo a liberação e preservação do DNA, e, em seguida, a mistura foi submetida ao vórtex, sendo posteriormente incubada em bloco aquecido a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, com agitação periódica a cada 5 minutos, temperatura utilizada para otimizar a atividade enzimática da Proteinase K e intensificar a degradação proteica.

Figura 10 - Reativação das amostras bacterianas para extração de DNA



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Tubos contendo 5 mL de caldo BHI inoculados com 100  $\mu$ L das amostras descongeladas, incubados a 37  $^{\circ}$ C por 18 a 22 horas para obtenção do crescimento necessário à extração de DNA.

Em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ L de NaCl 5M, homogeneizando-se o conteúdo por inversão (20 vezes). A adição do sal em alta concentração teve como finalidade promover a precipitação de proteínas e outras impurezas celulares, aumentando a força iônica da solução e facilitando a separação do DNA no sobrenadante, seguida de centrifugação por 22 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo de 2,0 mL, já identificado, onde foram adicionados 600  $\mu$ L de Etanol absoluto PA gelado e 30  $\mu$ L de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Esses reagentes foram utilizados para promover a precipitação do DNA, reduzindo sua solubilidade e neutralizando suas cargas negativas. A solução foi homogeneizada por inversão e incubada no freezer a -22  $^{\circ}$ C por uma noite (*overnight*), etapa que favorece a formação completa do precipitado de DNA e maximiza seu rendimento.

Após a incubação, realizou-se um vórtex rápido e a amostra foi centrifugada a 13.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi lavado com 500 µL de Etanol 70% (v/v) gelado, utilizado para remover sais e impurezas remanescentes sem solubilizar o DNA. Em seguida, o microtubo foi colocado em estufa a 50 °C por 30 minutos, a fim de evaporar o etanol residual e remover a umidade remanescente, garantindo a pureza do *pellet* de DNA antes da ressuspensão. O *pellet* seco foi ressuspendido com 50 a 200 µL de tampão TE (pH 8,0), preparado com Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM. Nesse tampão, o Tris atua mantendo o pH estável, enquanto o EDTA prende íons metálicos que poderiam ativar enzimas capazes de degradar o DNA, ajudando a protegê-lo. Após a ressuspensão, a amostra foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 65 °C por 10 minutos, favorecendo a completa dissolução do material genético.

#### 4.3 Caracterização molecular por PCR (GTG-fingerprinting)

Para as análises, as amostras de DNA foram inicialmente quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop®, com o objetivo de determinar sua concentração e avaliar a pureza do material genético. Em seguida, cada amostra foi diluída em H<sub>2</sub>O até atingir a concentração final de 70 ng/µL. Posteriormente, realizou-se a técnica de GTG-5 (*GTG-fingerprint*), que consiste na amplificação de regiões específicas do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo a distinção entre diferentes perfis genéticos.

As reações de PCR foram preparadas de acordo com o protocolo adaptado de Gever *et al.*, (2001) com 12,5 µL de Master Mix *Green Cellco*, que fornece todos os componentes essenciais para a amplificação (DNA polimerase, dNTPs, tampão e Íons), 2 µL de gelatina a 0,1% (p/v), utilizada como estabilizante da reação, 2 µL do primer (GTG)<sub>5</sub> a 10 pmol/µL responsável por iniciar a replicação; 4,5 µL de H<sub>2</sub>O e 4 µL do DNA previamente diluído a 70 ng/µL. A amplificação foi realizada no termociclador *Bio-Rad T100 Thermal Cycler*, utilizando o programa específico para GTG-5, composto por: desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos; seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 40 °C por 1 minuto (anelamento) e 65 °C por 8 minutos (extensão); finalizando com extensão à 75°C por 5 min; pós-ciclagem a 4°C .

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 g de agarose em 100 mL de TAE 1X, isto é, p/v). O tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), foi empregado por manter o pH estável e fornecer os íons necessários para a condução da corrente durante a migração eletroforética. O gel foi preparado contendo 6 µL de

brometo de etídio, corante intercalante que permite a visualização do DNA sob luz UV. Para a corrida, 4 µL do marcador de peso molecular *ladder* Cellco 1 kb foi aplicado em uma das canaletas, enquanto as demais foram preenchidas com os produtos de PCR. A separação eletroforética foi conduzida a 75 V por aproximadamente 150 minutos, condição que possibilitou boa resolução e distinção dos fragmentos amplificados. Assim, foi possível identificar clones por apresentarem o mesmo padrão genético dentro de cada rio e também descartar as amostras que não amplificaram.

#### **4.4 Amplificação de genes de virulência**

As amostras de *Escherichia coli* foram submetidas à amplificação dos genes de virulência por meio da técnica de PCR descrita por Chapman *et al.*, (2006) e posteriormente adaptada para este estudo. Para cada um dos cinco genes investigados, empregaram-se *primers* específicos, selecionados de acordo com as sequências-alvo de interesse e com o tamanho esperado dos *amplicons*. Os *primers* foram utilizados nas concentrações previamente padronizadas para cada reação, garantindo adequada eficiência de amplificação e especificidade para cada gene analisado, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação dos genes de virulência

Gene	Primers	Sequências dos Primers	Amplificação	Concentração do Primer
<i>stx1</i>	stx1 (Forward)	5'ATAAATCGCCTATCGTTGACTAC3'	180 pb	10 pmol/μL
	stx1 (Reverse)	5'AGAACGCCCACTGAGATCATC3'		
<i>stx2</i>	stx2 (Forward)	5'GGCACTGTCTGAAACTGCTCC3'	255 pb	10 pmol/μL
	stx2 (Reverse)	5'TCGCCAGTTATCTGACATTCTG3'		
<i>estI</i>	east 1 (Forward)	5'CCATCAACACAGTATATCCGA3'	111 pb	10 pmol/μL
	east 1 (Reverse)	5'GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT3'		
<i>cdt</i>	cdt3 (Forward)	5'GAGTTATTCCTTCCCCAGGC3'	108 pb	10 pmol/μL
	cdt3B (Reverse)	5'CAAAGGCATCAACAGCAGAA3'		
<i>eltA</i>	LTA-1 (Forward)	5'GGCGACAGATTATACCGTGC3'	696 pb	10 pmol/μL
	LTA-2 (Reverse)	5'CCGAATTCTGTTATATATGTC3'		

Fonte: Adaptada de CHAPMAN *et al.*, (2006)

Legenda: Sequências de primers específicos utilizados para a amplificação dos genes de virulência analisados neste estudo (*stx1*, *stx2*, *estI*, *cdt* e *eltA*), pb= pares de base.

As condições da PCR foram estabelecidas de acordo com a literatura (CHAPMAN, T. A. *et al.*, 2006), utilizando, para cada amostra, 1 μL do primer *forward* e 1 μL do primer *reverse*, ambos específicos para o gene a ser analisado, além de 7,5 μL de Master Mix (Cellco), 3,5 μL de H<sub>2</sub>O e 2 μL de DNA 70 ng/μL, totalizando 15 μL por reação. Cada gene foi amplificado utilizando um programa de ciclagem específico, definido de acordo com as características do par de primers utilizado.

As reações de PCR para os genes *estI*, *cdt* e *stx1* foram realizadas empregando o mesmo protocolo básico de ciclagem. Inicialmente, as amostras foram submetidas à desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguida de 26 ciclos constituídos por desnaturação a 94 °C, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos ciclos, procedeu-se à extensão final a 72 °C por 1 minuto e, posteriormente, as amostras foram mantidas a 8 °C por tempo indefinido, garantindo a estabilidade dos produtos amplificados. Para o gene *stx2*, empregou-se a mesma estrutura de ciclagem, desnaturação inicial, 26 ciclos e extensão final nas mesmas condições, porém com ajuste da temperatura de anelamento para 58 °C, em conformidade com a

especificidade do par de *primers* utilizados. De maneira semelhante, a reação para o gene *eltA* seguiu o mesmo protocolo geral, diferenciando-se apenas pela temperatura de anelamento, que foi ajustada para 52 °C, garantindo a eficiência do pareamento dos *primers* a esse alvo molecular.

#### 4.5 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio. Para a preparação do gel, foram utilizados 100 mL de solução TAE 1X e 2,3 g de agarose, previamente fundida em micro-ondas, com posterior adição de 4 µL de brometo de etídio. Antes do carregamento no gel, as amostras amplificadas foram preparadas com o tampão de carregamento 10x Phoneutria, garantindo adequada visualização e sedimentação na canaleta durante a corrida eletroforética. A seleção do marcador de peso molecular foi definida de acordo com o tamanho esperado dos *amplicons* de cada gene. Para os genes *estI* (111 bp), *cdt* (108 bp), *stx1* (180 bp) e *stx2* (255 bp), empregou-se a escada molecular Cellco de 50 bp, uma vez que esse marcador garantia resolução adequada para fragmentos de menor comprimento. Já para o gene *eltA*, cujo produto de amplificação apresenta 696 bp, utilizou-se a escada Cellco de 100 bp, mais apropriada para fragmentos de maior tamanho. A corrida eletroforética foi conduzida a 75 V por 40 minutos, permitindo a adequada separação dos produtos amplificados.

Para os genes *stx1* e *stx2*, foram utilizados controles positivos previamente caracterizados, capazes de amplificar especificamente as sequências-alvo correspondentes, assegurando a confiabilidade das reações de PCR. Após a corrida, os géis foram submetidos à fotodocumentação em sistema de captura de imagem sob luz ultravioleta, possibilitando o registro e a análise dos padrões de bandas obtidos. A interpretação dos resultados foi realizada por análise visual, considerando a presença de bandas com tamanho compatível ao esperado para cada gene alvo, em comparação com o marcador de peso molecular correspondente. Os isolados que apresentaram bandas específicas foram classificados como positivos (+) para o respectivo gene de virulência, enquanto aqueles que não

apresentaram amplificação visível foram classificados como negativos (-).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o período de coleta, foram obtidos 206 isolados de *Escherichia coli* na Estação Seca e 201 isolados na Estação Úmida. A confirmação preliminar das colônias foi realizada por meio do crescimento em meio Chromocult, seguido de estriamento em ágar MacConkey (Figura 11) e coloração de Gram (Figura 12), o que permitiu selecionar apenas os isolados compatíveis com o perfil morfológico, característico de *E. coli*.

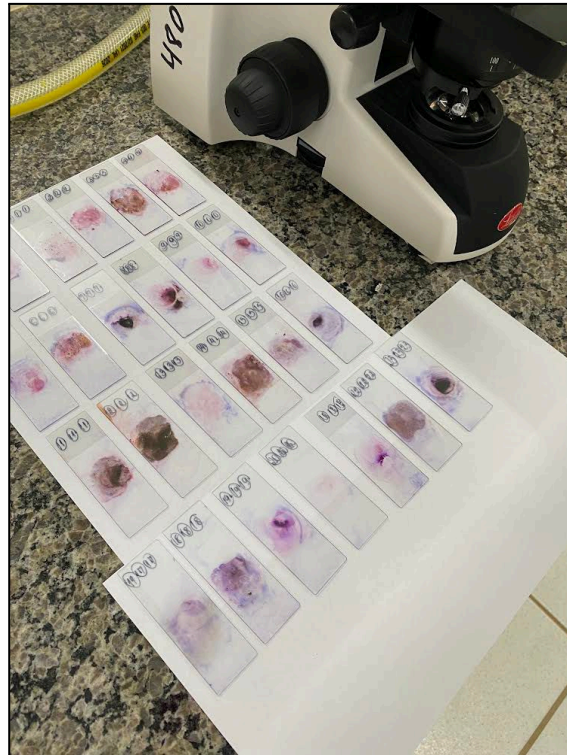
Figura 11 - Técnica de estria de esgotamento em meio de cultura ágar MacConkey



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Realização da técnica de estria de esgotamento em meio ágar MacConkey para obtenção de colônias bacterianas de *E. coli*. A identificação R1 refere-se ao Rio 1, P7 ao ponto de coleta no rio e I12 / I13 ao número do isolado de *Escherichia coli*.

Figura 12 - Coloração de Gram de isolado bacteriano obtido em Ágar MacConkey

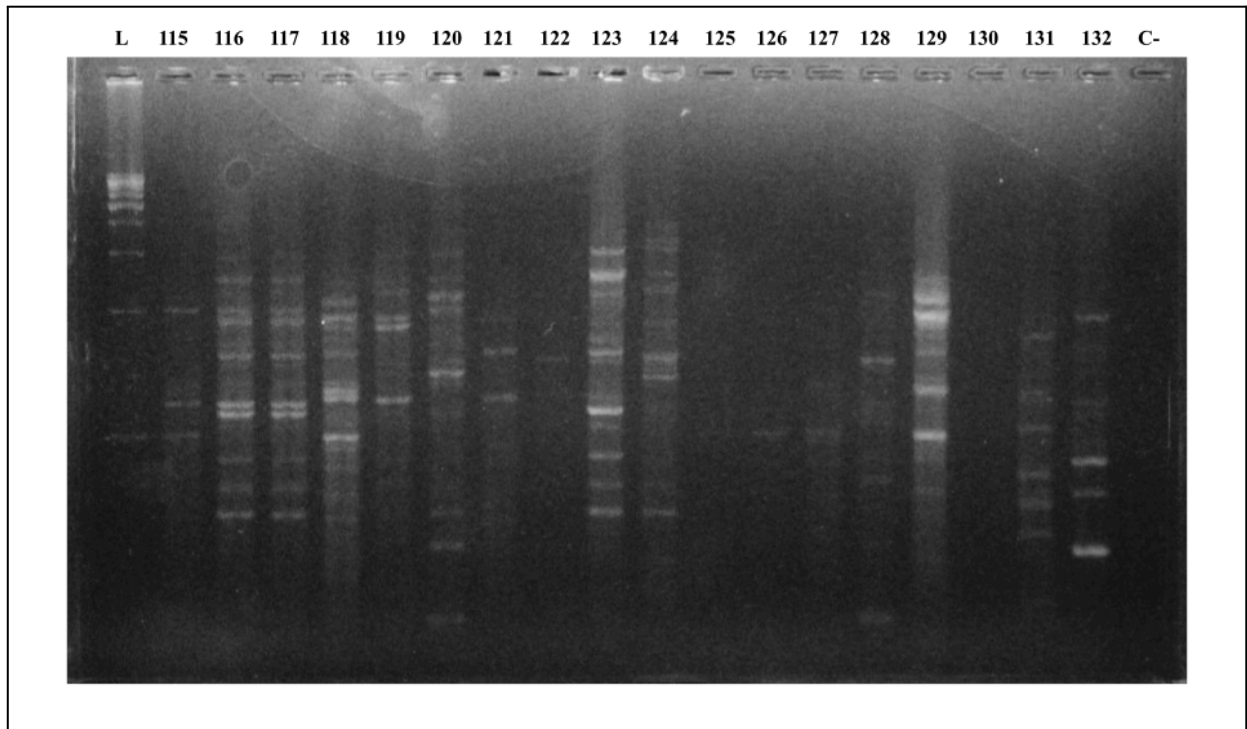


Fonte: Autora (2026)

Legenda: A imagem apresenta diferentes lâminas submetidas ao protocolo de coloração de Gram, para evidenciar a morfologia característica de bacilos Gram-negativos, compatível com *Escherichia coli*.

Após a confirmação, seguiu-se para extração do DNA, e todos os isolados foram submetidos à análise molecular pela técnica de GTG-5, na qual observou-se a presença de isolados clonais, identificados por padrões de bandas idênticos e falhas na amplificação de algumas amostras de DNA. No gel apresentado como exemplo (Figura 13), é possível visualizar essas ocorrências, bem como amostras que apresentaram falhas de amplificação, possivelmente relacionadas a limitações técnicas da extração ou da reação (amostras 122, 125, 126, 127 e 130) e as amostras que exibiram amplificação iguais (116 e 117), ou seja, consideradas clones entre si.

Figura 13 – Perfis de bandas obtido pela técnica GTG-5 da Estação Úmida



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Gel de eletroforese em agarose (1,5%) corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de amplificação por PCR dos isolados de *Escherichia coli*. O marcador de peso molecular (Ladder, L) de 1 kb foi utilizado como referência para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados. Observa-se a presença de isolados com perfis clonais, caracterizados por bandas com o mesmo padrão de migração (ex.: amostras 116 e 117), bem como a ausência de amplificação em algumas amostras (ex.: 122, 125, 126, 127 e 130), indicando possível ausência do gene alvo ou falha na reação de PCR.

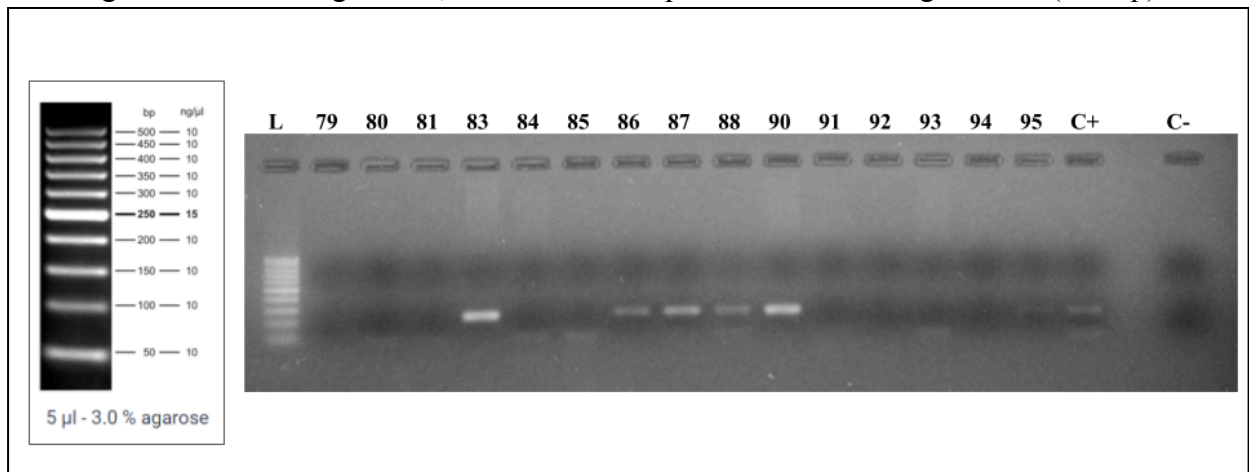
Essa abordagem permitiu identificar e excluir isolados clonais, assegurando que apenas perfis geneticamente distintos fossem considerados nas etapas subsequentes da análise molecular. O APÊNDICE A reúne todas as amostras submetidas ao procedimento de GTG-5 *fingerprinting* com o *primer* (GTG)<sub>5</sub>, no qual, após a exclusão de clones repetidos e de amostras cujo DNA não apresentou amplificação, foi obtido um total 118 amostras da Estação Seca e as 96 amostras da Estação Úmida geneticamente distintas entre si. Para cada amostra, o APÊNDICE A apresenta dados de identificação, quantificação do DNA (ng/μL), índices de pureza (A260/A280 e A260/A230), além do novo código gerado após a triagem genética, permitindo acompanhar a qualidade das extrações e a diversidade observada nos dois períodos amostrais.

Para otimizar as análises moleculares subsequentes, foi realizado um processo de seleção baseado na qualidade e concentração do DNA, bem como na representatividade de cada ponto de coleta, buscando manter, sempre que possível, pelo menos cinco amostras por ponto. A partir

desse critério, foram escolhidos 160 isolados para a etapa final da análise, sendo 80 da estação seca e 80 da estação úmida. No APÊNDICE A, essas amostras selecionadas estão devidamente indicadas em uma coluna específica, possibilitando a rastreabilidade de todo o processo de triagem utilizado.

Ao longo das análises, todas as 160 amostras foram submetidas à PCR para cada gene de virulência e, posteriormente, resolvidas em eletroforese em gel de agarose. Embora numerosos géis tenham sido produzidos ao longo do processo, para este trabalho foram selecionadas apenas imagens representativas, para cada um dos genes pesquisados, apresentadas nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

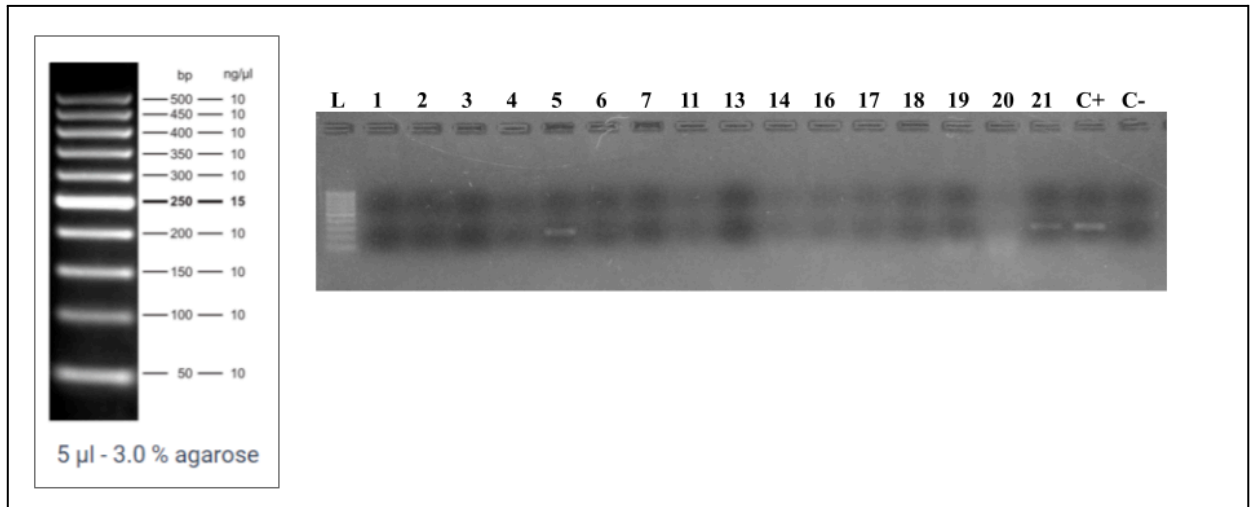
Figura 14 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene *estI* (111 bp).



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Eletroforese em gel de agarose a 2,3% dos produtos de PCR para detecção do gene *estI* (111 pb). O marcador de peso molecular utilizado foi *ladder* de 50 bp (Cellco). A amostra 42 corresponde ao controle positivo, apresentando banda compatível com o tamanho esperado do *amplicon*. As demais amostras analisadas (83, 86, 87, 88, 90 e 95) também apresentaram amplificação específica para o gene avaliado. O gel foi corado com brometo de etídio.

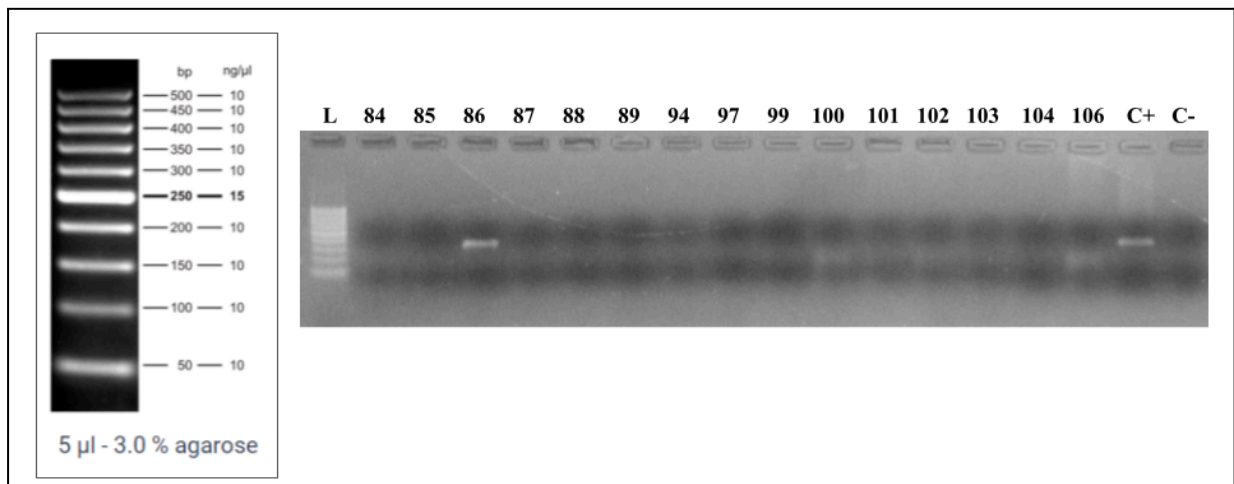
Figura 15 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene *cdt* (108 bp)



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Eletroforese em gel de agarose a 2,3% dos produtos de PCR para detecção do gene *cdt* (108 pb). O marcador de peso molecular utilizado foi ladder de 50 bp (Cellco). A amostra 39 corresponde ao controle positivo, apresentando banda compatível com o tamanho esperado do *amplicon*. As amostras 5 e 21 também apresentaram amplificação específica para o gene avaliado. O gel foi corado com brometo de etídio.

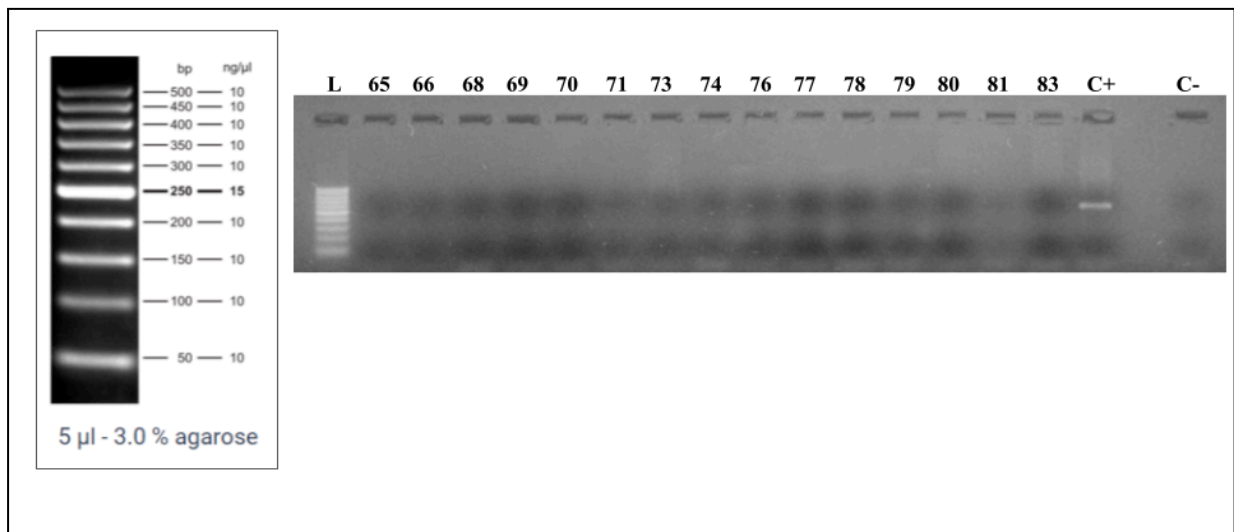
Figura 16 – Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene *stx1* (180 bp)



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Eletroforese em gel de agarose a 2,3% dos produtos de PCR para detecção do gene *stx1* (180 pb). O marcador de peso molecular utilizado foi ladder de 50 bp (Cellco). A amostra 86 apresentou amplificação específica compatível com o tamanho esperado do *amplicon*. O controle positivo consistiu em uma cepa cedida pela Universidade de São Paulo (USP), apresentando amplificação para o gene *stx1*. O gel foi corado com brometo de etídio.

Figura 17 - Gel de agarose 2,3% mostrando o produto de PCR do gene *stx2* (255 bp)



Fonte: Autora (2026)

Legenda: Eletroforese em gel de agarose a 2,3% dos produtos de PCR para detecção do gene *stx2* (255 pb). O marcador de peso molecular utilizado foi ladder de 50 bp (Cellco). Apenas o controle positivo, constituído por cepa cedida pela Universidade de São Paulo (USP), apresentou amplificação compatível com o tamanho esperado do *amplicon*. As demais amostras analisadas não apresentaram amplificação para o gene avaliado. O gel foi corado com brometo de etídio.

As interpretações basearam-se na presença de bandas compatíveis com os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados. Para os genes *estI* (111 bp) e *cdt* (108 bp), a identificação das bandas foi realizada por comparação com a escada molecular Cellco de 50 bp. Para os genes *stxI* (180 bp) e *stx2* (255 bp), além da comparação com a escada, utilizou-se controle positivo cedido pela Universidade Federal de São Paulo, o que permitiu confirmar a posição correta da banda correspondente em cada gel. Já para o gene *eltA* (696 bp), não houve amplificação em nenhuma das amostras analisadas, razão pela qual não há imagem correspondente.

Para garantir a rastreabilidade, desde o momento do isolamento cada colônia recebeu uma identificação baseada no rio de origem e a quantidade de perfis identificados, seguidas por uma letra que indica a estação do ano. Por exemplo, no Rio 1, durante a Estação Úmida, foram identificados quatro perfis distintos, nomeados como R1C1u, R1C2u, R1C3u e R1C4u, em que “R1” indica o rio, “C” refere-se ao número do clone, e “u” representa a Estação Úmida. As Tabelas 4 e 5 apresentam somente as amostras que amplificaram pelo menos um dos genes, respectivamente em isolados obtidos na Estação Seca e na Estação Úmida.

Tabela 4 - Amostras positivas para genes de virulência de *Escherichia coli* na Estação Seca

Amostras	Identificação do DNA Extraído	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>estI</i>	<i>cdt</i>	<i>eltA</i>
R1C3s	3	-	-	+	-	-
R1C5s	5	-	-	-	+	-
R1C8s	8	-	-	+	+	-
R1C11s	11	-	-	+	-	-
R3C4s	21	-	-	-	+	-
R4C1s	24	-	-	-	+	-
R10C6s	84	-	-	+	-	-
R10C8s	86	+	-	-	+	-
R10C10s	88	-	-	+	-	-
R10C11s	89	-	-	+	-	-
R11C3s	101	-	-	+	-	-
R11C4s	102	-	-	-	+	-

Fonte: Autor, 2026

Legenda: Relação das amostras que apresentaram amplificação para ao menos um dos genes investigados (*stx1*, *estI* e *cdt*) durante a Estação Seca. As amostras foram codificadas de acordo com o rio de origem, o número do clone identificado e a letra representativa da estação do ano (“s” = seca).

Tabela 5 - Amostras positivas para genes de virulência de *Escherichia coli* na Estação Úmida

Amostras	Identificação do DNA Extraído	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>estI</i>	<i>cdt</i>	<i>eltA</i>
R4C3u	35	-	-	+	-	-
R4C4u	36	-	-	+	-	-
R4C5u	37	-	-	+	-	-

R5C1u	39	-	-	-	+	-
R5C2u	40	-	-	+	-	-
R5C4u	42	-	-	+	-	-
R9C3u	78	-	-	+	-	-
R10C4u	83	-	-	+	-	-
R10C6u	85	-	-	-	+	-
R10C7u	86	-	-	+	-	-
R10C8u	87	-	-	+	-	-
R11C1u	88	-	-	+	-	-
R11C3u	90	-	-	+	-	-
R12C3u	95	-	-	+	-	-
R12C7u	99	-	-	-	+	-

Fonte: Autor, 2026

Legenda: Relação das amostras que apresentaram amplificação para ao menos um dos genes investigados (*stx1*, *stx2*, *estI* e *cdt*) durante a Estação Úmida. As amostras foram codificadas de acordo com o rio de origem, o número do clone identificado e a letra representativa da estação do ano (“u” = úmida).

A distribuição das amostras positivas para cada gene investigado é apresentada na Tabela 6, que sintetiza os resultados obtidos nas Estações Úmida e Seca.

Tabela 6 - Distribuição das amostras positivas por gene, com percentuais sazonais e gerais

Gene	Positivas (Úmida)	% Úmida	Positivas (Seca)	% Seca	Total (160)	% Geral
<i>stx1</i>	0	0%	1	1,25%	1	0,6%
<i>stx2</i>	0	0%	0	0%	0	0%
<i>estI</i>	12	15,0%	7	8,75%	19	11,9%
<i>cdt</i>	3	3,75%	6	7,5%	9	5,6%
<i>eltA</i>	0	0%	0	0%	0	0%

Fonte: Autora, 2026

Legenda: Distribuição das amostras positivas para os genes *stx1*, *stx2*, *estI*, *cdt* e *eltA* nas Estações Úmida e Seca, apresentando o número absoluto de detecções e o percentual sazonal calculado sobre 80 amostras por estação, além do percentual geral relativo ao total de 160 amostras analisadas.

Observou-se na Tabela 6: que a amplificação dos genes-alvo ocorreu em baixa frequência. Verificou-se que o gene *estI* foi o marcador mais frequentemente detectado, com 19 amostras positivas (11,9% do total), sendo 12 amostras da Estação Úmida (15,0%) e 7 amostras da Estação Seca (8,75%). O gene *cdt* apresentou 9 amostras positivas (5,6%), distribuídas em 3 amostras da Estação Úmida (3,75%) e 6 da Estação Seca (7,5%). Para o gene *stx1*, foi identificada apenas 1 amostra positiva na Estação Seca (1,25%), correspondendo a 0,6% do total de amostras analisadas. Não foi registrada amplificação para os genes *stx2* e *eltA* em nenhuma das estações, como apresentada na Tabela 6.

A persistência de genes de virulência no Rio 10 (R10) o caracteriza como um importante *hotspot* de contaminação na área de estudo, em razão de sua localização estar submetida a pressões antrópicas. Diferente de outros pontos que apresentam flutuações sazonais drásticas, o Rio 10 manteve-se positivamente relevante em ambas as estações. Na estação seca, o ponto destacou-se pela detecção do gene *estI* nas amostras R10C6s, R10C10s e R10C11s, além da presença dos genes *cdt* e *stx1* na amostra R10C8s. Já na estação úmida, a virulência persistiu com a detecção do gene *estI* nas amostras R10C4u, R10C7u e R10C8u, e do gene *cdt* especificamente na amostra R10C6u. Essa manutenção da carga genética sugere que o Rio 10 recebe uma contribuição constante de efluentes que não é neutralizada pelo efeito de diluição das chuvas, agindo como um reservatório crítico de *E. coli* patogênica para a região.

Em contraste, o Rio 1 (R1) apresenta um comportamento de "limpeza" ou diluição durante a transição para a estação úmida. Durante o período de seca, este rio apresentou diversas amostras positivas, incluindo os genes *estI* (R1C3s, R1C8s, R1C11s) e *cdt* (R1C5 e R1C8s). No entanto, os dados da estação úmida para o Rio 1, apresentados na Tabela 6, não registram amplificações para esses genes, indicando que o aumento do volume hídrico é suficiente para reduzir a concentração desses marcadores de virulência abaixo do limite de detecção. Geograficamente, a área em questão parece ser mais suscetível a um efeito regenerativo sazonal, uma vez que não está submetida a pressões antrópicas significativas.

Já os pontos identificados como Rio 4 e Rio 5 apresentam um aumento na detecção de genes de virulência durante a estação úmida. O gene *estI* foi detectado nas amostras R4C3u, R4C4u e R4C5u, bem como em R5C2u e R5C4u, e apenas R5C1u para o gene *cdt*, durante o período chuvoso. Nas coordenadas que situam esses rios, o aumento pode estar associado ao carreamento superficial de poluentes (lixiviação). A chuva, ao lavar o solo de áreas de pastagem ou descarte de resíduos, transporta linhagens de *E. coli* contendo os genes para o leito dos rios, elevando o risco ambiental justamente no período de maior volume de água (DIAMANTE, 2023).

Por fim, a análise dos rios mais distantes do núcleo central da área de estudo (R11 e R12) reforça a predominância do gene *estI* como o marcador de virulência mais amplamente disseminado na bacia hidrográfica avaliada. A detecção desse gene, mesmo em pontos mais periféricos, sugere uma dispersão ambiental consistente.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a presença de genes de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mananciais utilizados por produtores de QMAC na região da Serra da Canastra ocorreu em baixa frequência geral, embora com distribuição diferenciada entre as estações do ano. A detecção pontual de *stx1* e a ausência completa de amplificação para *stx2* e *eltA*, em contraste com a maior ocorrência dos genes *estI* e *cdt*, indica um cenário de circulação limitada de patótipos virulentos, mas revela a presença de linhagens portadoras de fatores associados à diarreia e à citotoxicidade, o que reforça a importância do monitoramento microbiológico dos recursos hídricos empregados na atividade queijeira.

O gene *estI* foi o mais prevalente no conjunto total de amostras, correspondendo a 11,9% das detecções (19 amostras), sendo mais frequente na estação úmida (15,0%) do que na estação seca (8,75%). No contexto ambiental, a elevada frequência de *estI* pode refletir fontes fecais (humanas ou animais), já que esse gene é comumente encontrado em isolados de *E. coli* de água de superfície (LAMONTAGE, 2023). Essa constatação reforça a preocupação sanitária, uma vez que há relatos de surtos humanos protagonizados por cepas que tinham somente *estI* como fator de virulência (KASHIMA, 2021). Portanto, a predominância de *estI* nas amostras sugere a possibilidade de contaminação fecal ambiental, mas não necessariamente indica a presença de cepas altamente patogênicas. Isso justifica a necessidade de monitoramento contínuo da água e a adoção de boas práticas de manejo hídrico na cadeia produtiva do QMAC, para mitigar riscos potenciais à saúde pública.

O segundo gene mais detectado foi *cdt*, presente em 5,6% das amostras, também com distribuição sazonal diferenciada: maior ocorrência na seca (7,5%) do que na úmida (3,75%). O gene *cdt*, que codifica a toxina *cdt*, é encontrado em diversos patótipos. Esta toxina causa danos ao DNA, bloqueio do ciclo celular e morte celular (SAVARINO *et al.*, 1991; MANAM; SUMATHI, 2022). Embora menos comum do que os genes associados à produção de Shiga toxina, o gene *cdt* é considerado um importante fator de virulência devido à sua capacidade de alterar tecidos epiteliais e modular a resposta imune (HUERTA *et al.*, 2025). A maior prevalência do gene na estação seca pode estar associada a fontes pontuais de contaminação fecal, mais evidentes nesse período em função da menor diluição dos efluentes, o que favorece a detecção de cepas específicas portadoras desse determinante de virulência, sem impactar significativamente a

frequência total de isolados positivos. Entretanto, essa dinâmica pode variar conforme as características ambientais e o uso do solo da área estudada. Nesse sentido, Araújo e colaboradores (2025) observaram baixa qualidade da água predominantemente durante a estação chuvosa, atribuída ao aumento do escoamento superficial de contaminantes para o corpo hídrico, evidenciando que os padrões sazonais de contaminação podem ser dependentes do contexto local.

Em contraste, o gene *stx1* apresentou baixa frequência, ocorrendo em apenas 0,6% das amostras, representado por um único isolamento durante a Estação Seca (1,25%). Ainda assim, sua detecção isolada, embora rara, não deve ser desconsiderada. Os fatores ambientais, como redução da pluviosidade, maior concentração de matéria orgânica e menor diluição hídrica, influenciam diretamente a persistência e a detecção de STEC em ambientes aquáticos (DÖPFER *et al.*, 2012). Assim, a amostra que apresentou resultado positivo (Tabela 6), observada na Estação Seca, pode refletir as condições ambientais mais favoráveis à estabilidade e à concentração de microrganismos, resultando em maior probabilidade de detecção de genes de virulência. Esse comportamento é semelhante ao relatado por Ferreira (2018), que observou maior prevalência de perfis contendo *stx1* em bovinos durante o período seco, em comparação ao período chuvoso.

Já o gene *stx2*, considerado epidemiologicamente o mais relevante por estar associado a quadros graves como colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (VISHRAM *et al.*, 2021), não foi detectado em nenhuma amostra. Esse achado é particularmente relevante, pois as cepas STEC representam um dos principais riscos de intoxicação a partir da ingestão de alimentos de origem láctea (HUSSEIN; BOLLINGER, 2005). A ausência de *stx2* sugere um baixo risco imediato de contaminação por cepas STEC altamente virulentas na água utilizada pelos produtores da região. Este resultado, contudo, deve ser interpretado com cautela, dado o potencial de contaminação de mananciais superficiais em regiões com atividades agropecuárias. O estudo de Tanaro *et al.*, (2018), realizado na Província de Entre Ríos, Argentina, demonstra o grave risco associado a ambientes aquáticos contaminados. Naquele estudo, o gene *stx2* foi encontrado em 100% das cepas de STEC O157:H7 isoladas de água de superfície em áreas de criação intensiva de gado.

Outro ponto relevante é a ausência completa do gene *eltA*, responsável pela codificação da toxina termo-lábil (LT). A não detecção desse gene sugere que cepas típicas de ETEC provavelmente não desempenham papel na contaminação desses mananciais. Essa interpretação é compatível nos achados de Pereira e colaboradores, (2024), que também não identificaram o gene *eltA* entre os isolados de *Escherichia coli* obtidos em um sistema de produção bovina. Embora o estudo tenha sido conduzido em amostras de leite de vacas com mastite clínica, sua relevância

ambiental permanece, uma vez que *E. coli* é reconhecida como um agente de mastite de origem ambiental, refletindo a microbiota presente em instalações rurais, bebedouros, solo e água utilizados pelos animais. A compatibilidade desses resultados reforça que, em ambientes rurais de produção agropecuária, cepas portadoras de gene *eltA* tendem a ser menos prevalentes.

Ao comparar a sazonalidade, nota-se que a estação úmida apresentou maior número de amostras positivas em relação à seca, sobretudo para o gene *estI*, enquanto a estação seca apresentou ligeira predominância no gene *cdt*. Essa distribuição se alinha a padrões hidrológicos conhecidos: durante a estação úmida, o maior volume de chuvas aumenta o carreamento superficial, transportando fezes de animais de pastagem e de fauna silvestre para os mananciais. Já em períodos secos, a diminuição do volume hídrico contribui para a maior concentração microbiana (SALIM *et al.*, 2020).

Esse comportamento sazonal reforça a importância de se considerar não apenas os fatores climáticos, mas também as condições ambientais e de manejo das áreas de captação de água associadas aos mananciais avaliados, especialmente no que se refere às condições de preservação das Áreas de Preservação Permanente (APPs) no entorno das nascentes. Estudos realizados em áreas rurais brasileiras demonstram que nascentes protegidas por vegetação ciliar apresentam melhor qualidade da água, com menores cargas de sedimentos e menor ocorrência de indicadores de contaminação fecal, quando comparadas a nascentes degradadas ou sem cobertura vegetal adequada (MARMONTEL, 2015; FRITZSONS E MANTOVANI, 2011). Embora esses trabalhos tenham sido conduzidos em ambientes distintos dos pontos amostrados no presente estudo, eles oferecem suporte conceitual para compreender o papel das APPs em trechos de rios utilizados para captação, uma vez que os processos de proteção exercidos pelas zonas ripárias são semelhantes.

Além disso, pesquisas indicam que a ausência de cercamento e o acesso direto de animais às áreas de nascente favorecem a introdução de microrganismos de origem fecal nos cursos d'água, aumentando o risco microbiológico para usos produtivos e domésticos (SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Dessa forma, os achados deste trabalho reforçam que a proteção efetiva das APPs e a adequação das estruturas de captação de água são fatores determinantes para a qualidade microbiológica dos mananciais na Serra da Canastra, contribuindo para a segurança sanitária da água utilizada na produção do Queijo Minas Artesanal.

No que se refere às implicações sanitárias, mesmo que a frequência absoluta de genes de virulência tenha sido baixa, a simples presença desses marcadores em águas utilizadas na cadeia produtiva do QMAC é relevante. O processo produtivo tradicional do Queijo Minas Artesanal da

Canastra envolve o uso do leite cru, sem pasteurização, o que torna o controle microbiológico de insumos, especialmente da água utilizada para ordenha, higiene de utensílios e limpeza de instalações, fundamental para a segurança do produto (BRASIL, 2019). A água contaminada pode representar fonte direta e indireta de introdução de microrganismos no leite (SILVA *et al.*, 2010).

Além disso, as baixas concentrações de cepas portadoras de fatores de virulência podem persistir no ambiente e servir como reservatórios genéticos, favorecendo a troca horizontal de genes entre bactérias ambientais e bactérias associadas ao gado (PEREIRA *et al.*, 2024). Isso é particularmente relevante para regiões de produção tradicional como a Serra da Canastra, onde a proximidade entre cursos d'água, áreas de pastagem e instalações de produção queijeira, cria um ecossistema microbiano dinâmico.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a necessidade de uma reflexão crítica sobre a adequação dos parâmetros microbiológicos utilizados para monitoramento da cadeia produtiva do QMAC. Embora a legislação vigente estabeleça limites específicos de coliformes para queijos de baixa e média umidade, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2, esses critérios foram elaborados para categorias tradicionais de queijos e, não contemplam plenamente as particularidades tecnológicas do QMAC, que ainda carece de definição normativa própria. A classificação do produto entre média ou baixa umidade depende do processo de dessoragem e do tempo de maturação, o que influencia diretamente os padrões microbiológicos aos quais ele deve ser comparado, o que pode gerar interpretações divergentes quanto à sua conformidade sanitária. Entretanto, mesmo quando os valores de coliformes se apresentam dentro dos limites aceitáveis, isso não garante a inexistência de riscos à saúde do consumidor, uma vez que esses critérios não avaliam a presença de genes de virulência em microrganismos veiculados no produto final. Assim, a detecção de *Escherichia coli* em níveis compatíveis com a legislação não exclui a possibilidade de circulação de cepas patogênicas, apontando para a importância de análises moleculares complementares. Dessa forma, o presente estudo reforça a limitação dos parâmetros normativos atuais e a necessidade de atualizações que considerem a singularidade do QMAC e a complexidade microbiológica associada ao produto e à sua cadeia produtiva.

Outro aspecto relevante diz respeito às limitações metodológicas do presente estudo. As cepas detectadas foram obtidas por isolamento em meio seletivo e posterior análise molecular, restringindo a detecção apenas aos isolados viáveis e cultiváveis. Além disso, as bandas amplificadas nos ensaios de PCR não foram submetidas a sequenciamento, o que impede a confirmação definitiva de que os fragmentos correspondem exatamente aos genes-alvo inferidos. Essa ausência de validação por sequenciamento reduz a identificação molecular e reforça a

necessidade de cautela na interpretação dos resultados aqui apresentados, destacando a importância de abordagens complementares, como qPCR quantitativo e sequenciamento metagenômico, em investigações futuras.

De modo geral, o risco imediato para a cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal Canastra parece ser reduzido; entretanto, os achados reforçam a necessidade de monitoramento sistemático da qualidade microbiológica da água, tanto pela perspectiva da segurança alimentar quanto da saúde pública. A implementação contínua de medidas preventivas e o aprimoramento das práticas de manejo hídrico são essenciais para minimizar a exposição de produtores e consumidores a microrganismos potencialmente patogênicos, preservando a qualidade sanitária e a sustentabilidade da produção tradicional desta importante região.

## 6 CONCLUSÃO

De modo geral, o risco imediato para a cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal Canastra mostrou-se reduzido, considerando a baixa frequência de genes de virulência detectados e a ausência dos genes *stx2* e *eltA* nas amostras analisadas. No entanto, a elevada prevalência do gene *estI*, seguido do gene *cdt*, bem como a detecção pontual de *stx1*, indicam que a simples presença desses marcadores em mananciais utilizados na produção do QMAC é epidemiologicamente relevante, configurando um potencial risco à saúde pública e à segurança do alimento.

Esses resultados evidenciam limitações dos parâmetros normativos atualmente adotados para avaliação da qualidade microbiológica da água, os quais se baseiam em indicadores clássicos, como os coliformes, sem considerar a presença de genes de virulência. Assim, cepas de *Escherichia coli* podem estar presentes em concentrações consideradas aceitáveis pela legislação vigente, mas ainda assim apresentar potencial patogênico.

Nesse contexto, o presente estudo reforça a necessidade de ações ambientais preventivas, como o fortalecimento da proteção das áreas de entorno dos mananciais, a preservação das Áreas de Preservação Permanente (APPs), o controle de fontes difusas de contaminação e o aprimoramento das práticas de manejo hídrico nas propriedades produtoras. Tais medidas contribuem não apenas para a redução do risco microbiológico, mas também para a sustentabilidade ambiental e produtiva da cadeia do QMAC.

Além disso, este estudo aponta para a importância de pesquisas futuras que ampliem a abordagem adotada, incluindo análises sazonais mais extensas, a avaliação da expressão gênica ou da produção efetiva de toxinas, bem como a integração de dados microbiológicos da água, do ambiente e do produto final. Investigações com maior número de amostras e a incorporação de metodologias complementares poderão fornecer uma compreensão mais abrangente dos riscos microbiológicos associados à produção tradicional do Queijo Minas Artesanal Canastra.

Conclui-se, portanto, que o monitoramento sistemático da qualidade microbiológica da água, aliado à implementação contínua de medidas ambientais preventivas e ao avanço das abordagens analíticas, é fundamental para assegurar a qualidade sanitária, a segurança alimentar e a valorização sustentável dessa produção tradicional.

## REFERÊNCIA

ABDULATEEF, S. A.; AAL OWAI F, H. A.; HUSSEIN, M. H. Importance of virulence factors in bacterial pathogenicity: a review. *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*, v. 3, n. 4, p. 765–769, 2023. DOI: 10.47191/ijmscrs/v3-i4-35.

ARAÚJO, M. F. R. F. *et al.*, Seasonal assessment of water quality in an urban stretch of the Neves River, Northeast Brazil. *Saúde Meio Ambiente*, v. 14, p. 135–147, 2025. DOI: 10.24302/sma.v14.5957.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE QUEIJO CANASTRA. Região da Canastra. Queijo da Canastra, [s.d.]. Disponível em: <https://queijodacanastra.com.br/regiao/> . Acesso em: 18 ago. 2025.

BATT, C. A. *Escherichia coli*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (ed.). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 688–694. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2> .

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Queijos artesanais brasileiros. Brasília, DF: IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1137070/queijos-artesanais-brasileiros> . Acesso em: 26 ago. 2025.

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra da Canastra. Brasília, DF: ICMBio, 2005.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 jul. 2019. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2019/lei/113860.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/113860.htm) . Acesso em: 17 nov. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria MAPA nº 146, de 07 de março de 1996. 1996. Disponível em:

<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996.669.html> .

Acesso em: 19 mar. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n.º 888, de 4 de maio de 2021. Dispõe sobre procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 maio 2021. Seção 1, p. 15. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>

. Acesso em: 31 ago. 2025.

CÂNDIDO, J. G. Serra da Canastra: dicas, atrações e roteiros incríveis. Portal Minas Gerais, 28 set. 2022. Disponível em:

<https://www.minasgerais.com.br/pt/blog/artigo/serra-da-canastra-dicas-atracoes-e-roteiros-incrives>

. Acesso em: 11 jun. 2025.

CHAPMAN, T. A. et al., Comparison of virulence gene profiles of Escherichia coli strains isolated from healthy and diarrheic swine. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 7, p. 4782–4795, 2006. DOI: 10.1128/AEM.02885-05

DIAMANTE, L. J. S. Impacto da produção artesanal de queijos em mananciais da Serra da Canastra. 2023. Dissertação (Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental) – Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí, Bambuí, 2023.

DUPIN, L. V. “Eu sou parte de uma classe de produtores que perdeu a sabedoria lá de trás e começou a pisar dentro das tecnologias”: trajetórias camponesas na fabricação de queijos artesanais em Minas Gerais. Antípoda. Revista de Antropología y Arqueología, n. 40, p. 153–173, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7440/antipoda40.2020.07>

ESTRADA-GARCIA, T. et al., Enterοaggregative coli: a pathogen bridging the North and South. Current Tropical Medicine Reports, v. 1, n. 2, p. 88–96, 2014. DOI: 10.1007/s40475-014-0018-7.

FERREIRA, M. R. A. Distribuição dos genes stx1 e stx2 em Escherichia coli isoladas de bovinos de leite de acordo com a estação, idade e escala de produção na região sudoeste de Goiás, Brasil. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de

Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstreams/bfaec89b-a093-4479-920c-45cf43bfla67/download> .

Acesso em: 16 nov. 2025.

FRITZSONS, E.; MANTOVANI, L. E. Influência da vegetação ciliar na qualidade da água em microbacias hidrográficas. *Floresta*, Curitiba, v. 41, n. 3, p. 523–534, 2011.

GARCÍA, A.; FOX, J. G. 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. DOI: 10.30802/AALAS-CM-20-000054.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, v. 205, n. 1, p. 31–36, 2001. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x.

GONÇALVES, E. S.; MARQUES, M. H. M.; LUCCA, P. S. R. A segurança alimentar e os consumidores: um breve estudo sobre a *Escherichia coli*. *Revista CESUMAR – Ciências Humanas e Sociais Aplicadas*, Maringá, v. 7, n. 1, p. 7–29, dez. 2002.

GWIMBI, P.; GEORGE, M.; RAMPHALILE, M. Contaminação bacteriana de fontes de água potável em aldeias rurais da Bacia de Mohale, Lesoto: exposições por meio de práticas de saneamento e higiene na vizinhança. *Environmental Health and Preventive Medicine*, v. 24, 33, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0790-z>

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 10, p. 2224–2241, 2005. DOI: 10.4315/0362-028x-68.10.222

HUERTA-CANTILLO, J. et al., Cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Mexican children harbor different *cdt* types causing *cdt*-induced epithelial pathological phenotypes. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 214, n. 1, p. 7, 2025. DOI: 10.1007/s00430-025-00816-4.

KASHIMA, K. et al., An outbreak of food poisoning due to Escherichia coli serotype O7:H4 carrying astA for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiology and Infection*, v. 149, e244, 2021. DOI: 10.1017/S0950268821002338.

KIM, J.-S.; LEE, M.-S.; KIM, J. H. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing Escherichia coli and its potential reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00273>

LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 76, n. 4, 2009.

LAMONTAGNE, C. D. et al., Relating antimicrobial resistance and virulence in surface-water E. coli. *Microorganisms*, v. 11, n. 11, 2647, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112647> .

LEACH, S. et al., The adjuvant double mutant Escherichia coli heat labile toxin enhances IL-17A production in human T cells specific for bacterial vaccine antigens. *PLOS ONE*, v. 7, n. 12, e51718, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0051718

MADIGAN, M. T. et al., *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARMONTEL, C. V. F.; RODRIGUES, V. A. Parâmetros indicativos da qualidade da água em nascentes com diferentes níveis de conservação da vegetação ciliar. **Floresta e Ambiente**, *Seropédica*, v. 22, n. 2, p. 171–181, 2015.

MANAM, V. K.; SUMATHI, G. (org.). *Frontiers in Microbiology*. Tamilnadu: Scieng Publications, 2022. ISBN 978-93-94766-29-7.

MASTERS, N. et al., Escherichia coli virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Research*, v. 45, n. 20, p. 6321–6333, 2011.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Determinação de coliformes e Staphylococcus coagulase positiva em queijo Minas frescal. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Paraná, v. 6, n. 2, p. 842–851, 2012.

MENDOZA SASSI, R. A. et al., Microrganismos patogênicos em amostras de água no porto brasileiro de Rio Grande: um problema de saúde pública. *VITTALLE – Revista de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 2, p. 51–61, 2011. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/1498> .

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n. 1, p. 43–60, 2002. DOI: 10.1080/1040-840291046687.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.810, de 24 de abril de 2018. Estabelece normas para a produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2018.

NASCIMENTO SANTOS, N. G. et al., Water quality monitoring in southern Brazil and the assessment of risk factors related to contamination by coliforms and *Escherichia coli*. *Journal of Water and Health*, v. 21, n. 10, p. 1550–1561, 2023. DOI: 10.2166/wh.2023.182.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NUNES, A. A. T. Resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em *Klebsiella* sp. isoladas da laguna de Tramandaí. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/178306> .

OCHMAN, H. Evolution of bacterial pathogens. In: \_\_\_\_\_. *Principles of Bacterial Pathogenesis*. [S.l.]: Academic Press, 2001. p. 1–41.

OLIVEIRA, A. B. A. de et al., Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre*, v. 30, n. 3, p. 279–285, 2010.

OLIVEIRA, L. F. C. et al. Influência do uso e ocupação do solo na qualidade da água em bacias hidrográficas rurais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande*, v. 21, n. 10, p. 711–716, 2017.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1). Acesso em: 24 Ago. 2025.

PAIVA DE SOUSA, C.; DUBREUIL, J. D. Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, n. 1, p. 15–20, 2001. DOI: 10.1078/1438-4221-00097.

PAKBIN, B.; BRÜCK, W. M.; ROSSEN, J. W. A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>

PANDEY, P. K. et al., Contaminação de recursos hídricos por bactérias patogênicas. *AMB Express*, v. 4, 51, 2014. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111 and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology, Washington*, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clinical Microbiology Reviews, Washington*, v. 11, p. 450–479, 1998.

PEREIRA, D. M. et al., Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* as the main DEC pathotype isolated from a clinical case in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 44, e07143, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7430> . Acesso em: 17 nov. 2025.

RIGOBELLO, E. C. et al., Fatores de virulência de *Escherichia coli* isolada de bezerros com diarreia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 3, p. 305–310, 2006.

RODRIGUES, J. F. et al., Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by natural isolates of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 5222–5233, 2011.

RUAN, X. et al., *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day-old gnotobiotic pigs. *PLOS ONE*, v. 7, n. 8, e43203, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043203.

SANTOS, K. R. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal produzido na Serra da Canastra – MG. 2013. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SAVARINO, S. J. et al., Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *Journal of Clinical Investigation*, v. 87, n. 4, p. 1450–1455, 1991. DOI: 10.1172/JCI115151.

SHEIKH, A. et al., Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin drives enteropathic changes in small intestinal epithelia. *Nature Communications*, v. 13, art. 6886, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-34687-7.

SHIMA, K. et al., Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens*. *Microbial Pathogenesis*, v. 53, n. 3–4, p. 125–133, 2012.

SILVA, G.; DUTRA, P. R. S.; CADIMA, I. M. Higiene na indústria de alimentos: Curso Técnico em Alimentos – Modalidade à Distância. Recife: EDUFRPE, 2010. 134 p. ISBN 978-85-7946-068-5.

SILVA, J. et al., Surtos alimentares de origem bacteriana: uma revisão. Universidade Federal de Goiás (UFG), CERCOMP, 2012. Disponível em:

[https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/SURTOS\\_ALIMENTARES\\_-\\_UMA\\_REVISAO-definitivo\\_Julierme.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/SURTOS_ALIMENTARES_-_UMA_REVISAO-definitivo_Julierme.pdf) . Acesso em: 28 jul. 2025.

SILVA, L. E. et al., Detecção e análise genética do gene da enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAST1) em isolados clínicos de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). *BMC Microbiology*, v. 14, 135, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-135>

SILVA, A. M. et al. Qualidade da água de nascentes em áreas rurais sob diferentes formas de uso do solo. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 123–132, 2014.

SILVA, R. A. B. et al., Doenças veiculadas por alimentos: uma breve revisão. Instituto Federal do Espírito Santo, 2020. Disponível em:

<https://repositorio.ifes.edu.br/bitstream/handle/123456789/3613/ARQUIVO.pdf> . Acesso em: 14 jul. 2025.

TANARO, J. D. et al., Perfil de virulência de cepas de *Escherichia coli* O157 isoladas de águas superficiais em áreas de criação de gado. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 484–490, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12873>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Investigação de surto de *E. coli* O157:H7: cebolas (outubro de 2024). [S.l.]: FDA, out. 2024. Disponível em:

<https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/safe-food-handling> . Acesso em: 31 ago. 2025.

UNESCO. Modos de fazer o Queijo Minas Artesanal integram Lista do Patrimônio Cultural Imaterial da UNESCO. UNESCO, 4 dez. 2024. Disponível em:

<https://www.unesco.org/pt/articles/modos-de-fazer-o-queijo-minas-artesanal-integram-lista-do-patrimonio-cultural-imaterial-da-unesco> . Acesso em: 1 maio 2025.

USP – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Da diarreia à síndrome hemolítica urêmica: uma toxina chamada Shiga. Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, [s.d.].

Disponível em:

<https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-medica/da-diarreia-a-sindrome-hemolitica-uremica-uma-toxina-chamada-shiga/> . Acesso em: 8 set. 2025.

VISHRAM, B. et al., The emerging importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England. *Journal of Medical Microbiology*, v. 70, n. 7, 001375, 2021. DOI: 10.1099/jmm.0.001375.

ZASSI DANTAS, M. S. et al., Impact of fecal contamination on surface water quality in the São Francisco River hydrographic basin in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 18, n. 1, p. 48–59, 2020. DOI: 10.2166/wh.2019.153.

## APÊNDICE

APÊNDICE A - Planilha de quantificação do DNA das amostras da Estação Seca e Estação Úmida						
Identificação	Nova Identificação	ng/μL	A260/A280	A260/A230	Selecionada	Código DNA
1.1 I 1 s	R1C1s	726.3	2.13	2.46	sim	1s
1.4 I 1 s	R1C2s	828.2	2.14	2.5	sim	2s
1.4 I 4 s	R1C3s	573.5	2.13	2.46	sim	3s
1.5 I 3 s	R1C4s	527.5	2.13	2.45	sim	4s
1.5 I 4 s	R1C5s	682.9	2.11	2.45	sim	5s
1.5 I 5 s	R1C6s	706.6	2.12	2.48	sim	6s
1.5 I 6 s	R1C7s	613.1	2.12	2.58	sim	7s
1.7 I 1 s	R1C8s	423.9	2.11	2.44	sim	8s
1.8 I 5 s	R1C9s	292.3	2.03	1.64	-	9s
1.10 I 2 s	R1C10s	350.3	1.95	1.20	-	10s
1.10 I 3 s	R1C11s	699.1	1.97	1.44	sim	11s
2.6 I 1 s	R2C2s	985.6	2.07	2.22	sim	13s
2.9 I 2 s	R2C3s	124.9	2.11	08.01	sim	14s
2.11 I 1 s	R2C4s	8.8	1.29	0.37	sim	15s
2.12 I 1 s	R2C5s	173.9	1.99	1.54	sim	16s

2.12 I 3 s	R2C6s	100.1	1.91	1.55	sim	17s
3.1 I 1 s	R3C1s	4587.9	2.03	02.07	sim	18s
3.2 I 1 s	R3C2s	297.8	1.73	0.70	sim	19s
3.7 I 1 s	R3C3s	894.7	1.85	01.02	sim	20s
3.7 I 3 s	R3C4s	270.4	1.71	0.92	sim	21s
3.8 I 1 s	R3C5s	1512.2	1.84	1.10	sim	22s
3.9 I 3 s	R3C6s	526.3	1.25	0.45	sim	23s
4.2 I 5 s	R4C1s	1044.0	1.72	0.82	sim	24s
5.1 I 2 s	R5C1s	795.4	1.90	1.12	sim	25s
5.1 I 3s	R5C2s	557.9	1.95	1.86	sim	26s
5.1 I 4 s	R5C3s	1056.8	1.98	1.37	sim	27s
5.2 I 1 s	R5C4s	1234.7	2.11	2.17	sim	28s
5.3 I 2 s	R5C5s	872.4	1.94	1.65	sim	29s
5.4 I 1 s	R5C6s	987.0	1.89	1.20	sim	30s
5.4 I 2 s	R5C7s	2616.4	1.95	1.46	sim	31s
5.4 I 3 s	R5C8s	393.3	1.22	1.83	sim	32s
5.5 I 1 s	R5C9s	932.9	1.82	0.94	sim	33s
6.1 I 1 s	R6C1s	867	1.99	1.39	sim	34s
6.1 I 2 s	R6C2s	1947.7	1.96	1.38	sim	35s
6.3 I 1 s	R6C3s	23.0	1.99	02.01	sim	36s
6.5 I 5 s	R6C4s	504.4	1.96	1.41	sim	37s
7.6 I 5 s	R7C1s	1039.5	1.98	1.66	sim	38s
7.9 I 3 s	R7C2s	1338.3	1.96	1.38	sim	39s
7.10 I 1 s	R7C3s	829.0	1.99	1.52	sim	40s
8.2 I 1 s	R8C1s	575.4	1.95	1.22	-	41s
8.2 I 2 s	R8C2s	439.4	1.94	1.26	-	42s
8.2 I 3 s	R8C3s	1492.7	2.00	1.37	sim	43s
8.3 I 2 s	R8C4s	190.7	1.72	0.72	-	44s
8.3 I 3 s	R8C5s	477.10	1.97	1.33	-	45s
8.4 I 1 s	R8C6s	782.2	2.03	1.52	-	46s
8.4 I 2 s	R8C7s	136.5	1.99	1.51	-	47s
8.4 I 3 s	R8C8s	413.1	1.59	0.63	-	48s
8.5 I 2 s	R8C9s	947.8	1.53	0.54	sim	49s
8.5 I 5 s	R8C10s	1759.3	1.73	0.77	sim	50s
8.6 I 2 s	R8C11s	481.6	1.76	0.84	-	51s

8.6 I 5 s	R8C12s	982.5	1.85	01.04	sim	52s
8.7 I 1 s	R8C13s	772.3	1.96	1.65	-	53s
8.7 I 2 s	R8C14s	1563.3	1.90	1.38	sim	54s
8.7 I 3 s	R8C15s	1255.3	02.08	1.71	sim	55s
8.7 I 4 s	R8C16s	1148.9	2.10	02.03	sim	56s
8.9 I 3 s	R8C17s	815.5	2.12	1.91	sim	57s
8.9 I 4 s	R8C18s	778.9	1.99	1.51	-	58s
8.10 I 1 s	R8C19s	1006.3	1.90	1.13	sim	59s
9.1 I 2 s	R9C2s	552.5	2.11	1.83	-	61s
9.1 I 3 s	R9C3s	261.0	1.85	1.22	-	62s
9.1 I 4 s	R9C4s	327.9	2.00	1.62	-	63s
9.1 I 5 s	R9C5s	829.1	2.04	1.66	sim	64s
9.2 I 1 s	R9C6s	1007.2	2.02	1.66	sim	65s
9.2 I 2 s	R9C7s	615.0	2.05	1.64	-	66s
9.3 I 1 s	R9C8s	549.3	1.85	1.36	-	67s
9.5 I 1 s	R9C9s	596.4	2.03	1.58	-	68s
9.6 I 1 s	R9C10s	841.4	1.74	0.79	sim	69s
9.6 I 2 s	R9C11s	286.8	2.07	1.84	-	70s
9.6 I 3 s	R9C12s	1128.3	2.06	1.74	sim	71s
9.7 I 1 s	R9C13s	762.6	2.01	1.61	-	72s
9.7 I 2 s	R9C14s	668.7	2.11	1.93	-	73s
9.7 I 5 s	R9C15s	956.1	2.04	1.76	sim	74s
9.9 I 1 s	R9C16s	1317.6	2.10	1.84	sim	75s
9.9 I 2 s	R9C17s	1153.5	2.08	1.82	sim	76s
9.9 I 3 s	R9C18s	1017.9	2.06	1.64	sim	77s
9.10 I 3 s	R9C19s	877.7	02.05	1.66	sim	78s
10.1 I 1 s	R10C1s	603.1	1.92	1.20	-	79s
10.2 I 3 s	R10C2s	605.3	2.06	1.65	-	80s
10.2 I 6 s	R10C3s	776.6	2.04	1.50	-	81s
10.3 I 1 s	R10C4s	650.7	2.00	1.58	-	82s
10.3 I 3 s	R10C5s	556.0	1.98	1.40	-	83s
10.3 I 4 s	R10C6s	874.5	1.91	1.16	sim	84s
10.3 I 5 s	R10C7s	817.9	2.02	1.59	sim	85s
10.3 I 6 s	R10C8s	779.4	2.06	1.65	sim	86s
10.4 I 1 s	R10C9s	833.6	1.96	1.28	sim	87s

10.6 I 2 s	R10C10s	938.5	1.93	1.16	sim	88s
10.7 I 1 s	R10C11s	923.3	1.99	1.46	sim	89s
10.7 I 2 s	R10C12s	704.3	2.00	1.21	-	90s
10.8 I 2 s	R10C13s	445.8	2.03	1.53	-	91s
10.8 I 4 s	R10C14s	766.8	2.04	1.65	-	92s
10.9 I 1 s	R10C15s	556.8	1.94	02.02	-	93s
10.9 I 2 s	R10C16s	997.0	1.99	1.40	sim	94s
10.9 I 3 s	R10C17s	771.5	2.00	1.44	-	95s
10.10 I 1 s	R10C18s	404.6	1.96	1.33	-	96s
10.10 I 4 s	R10C19s	868.2	2.07	1.83	sim	97s
10.12 I 1 s	R10C20s	181.8	1.69	0.81	-	98s
11.5 I 1 s	R11C1s	944.8	2.06	1.51	sim	99s
11.5 I 2 s	R11C2s	485.2	2.00	1.39	sim	100s
11.8 I 1 s	R11C3s	881.9	2.03	1.72	sim	101s
11.10 I 1 s	R11C4s	1034.3	1.93	1.20	sim	102s
11.10 I 5 s	R11C5s	590.0	1.95	1.29	sim	103s
12.1 I 1 s	R12C1s	1091.8	2.09	1.73	sim	104s
12.2 I 1 s	R12C2s	584.5	2.04	1.64	-	105s
12.3 I 1 s	R12C3s	987.3	2.02	1.66	sim	106s
12.3 I 2 s	R12C4s	1048.5	2.03	1.80	sim	107s
12.3 I 3 s	R12C5s	569.0	2.04	1.57	-	108s
12.3 I 5 s	R12C6s	841.4	1.94	1.34	sim	109s
12.6 I 1 s	R12C7s	904.2	1.97	1.33	sim	110s
12.6 I 4 s	R12C8s	725.3	2.02	1.53	sim	111s
12.7 I 4 s	R12C9s	968.9	02.04	1.55	sim	112s
12.8 I 2 s	R12C10s	983.3	02.09	1.69	sim	113s
12.8 I 4 s	R12C11s	803.5	02.04	1.63	sim	114s
12.9 I 2 s	R12C12s	368.8	1.70	0.89	-	115s
12.10 I 3 s	R12C13s	941.1	02.07	1.68	sim	116s
12.11 I 1 s	R12C14s	895.5	02.04	1.70	sim	117s
12.11 I 3 s	R12C15s	655.8	02.04	1.56	sim	118s
12.11 I 5 s	R12C16s	120.2	02.08	2.18	-	119s
12.11 I 6 s	R12C17s	778.2	1.98	1.49	sim	120s
R1P1 I 2 U	R1C1u	83.4	1.72	1.01	sim	1u
R1P4 I 6 U	R1C2u	201.7	1.90	1.45	sim	2u

R1P4 I7 U	R1C3u	247.5	1.88	1.28	sim	3u
R1P6 I9 U	R1C4u	28.1	1.44	0.52	sim	4u
R2P1 I7 U	R2C1u	57.1	1.60	0.59	-	5u
R2P1 I8 U	R2C2u	61.0	1.82	1.61	-	6u
R2P2 I2 U	R2C4u	73.5	1.68	0.92	sim	8u
R2P3 I3 U	R2C5u	47.6	1.84	1.47	-	9u
R2P3 I5 U	R2C6u	51.0	1.80	1.49	-	10u
R2P6 I9 U	R2C7u	1685.7	1.88	1.43	sim	11u
R2P8 I12 U	R2C8u	32.0	1.79	1.69	-	12u
R2P10 I17 U	R2C10u	145.8	1.89	1.89	sim	14u
R2P10 I18 U	R2C11u	38.4	1.87	1.30	-	15u
R2P10 I20 U	R2C12u	73.0	1.86	1.79	sim	16u
R2P10 I24 U	R2C14u	33.1	1.79	1.21	-	18u
R2P10 I25 U	R2C15u	48.0	1.78	1.43	-	19u
R2P10 I30 U	R2C16u	44.7	1.72	1.03	-	20u
R2P10 I31U	R2C17u	84.1	1.94	1.98	sim	21u
R3P1 I3 U	R3C1u	947.0	1.99	1.63	sim	22u
R3P2 I5 U	R3C2u	238.5	1.98	1.53	sim	23u
R3P4 I9 U	R3C3u	139.1	1.98	1.63	sim	24u
R3P4 I10 U	R3C4u	966.1	1.97	1.37	sim	25u
R3P4 I14 U	R3C5u	1342.5	1.95	1.36	sim	26u
R3P6 I19 U	R3C6u	245.5	1.86	1.31	sim	27u
R3P6 I21 U	R3C7u	658	1.94	1.44	sim	28u
R3P8 I24 U	R3C8u	605.8	1.97	1.32	sim	29u
R3P9 I26 U	R3C9u	635.2	1.87	1.39	sim	30u
R3P9 I28 U	R3C10u	514.1	1.95	1.51	sim	31u
R3P9 I29 U	R3C11u	1531.4	1.88	1.23	sim	32u
R4P1 I3 U	R4C1u	246.4	1.87	1.15	sim	33u
R4P1 I7 U	R4C2u	313.4	1.78	1.03	sim	34u
R4P1 I9 U	R4C3u	1665.8	2.02	1.46	sim	35u
R4P1 I10 U	R4C4u	1497.6	2.02	1.56	sim	36u
R4P1 I15 U	R4C5u	130.8	1.86	2.21	sim	37u
R4P2 I31 U	R4C6u	24.7	1.75	1.01	sim	38u
R5P1 I2 U	R5C1u	211.5	2.00	1.59	sim	39u
R5P1 I3 U	R5C2u	194.9	2.00	2.02	sim	40u

R5P1 I4 U	R5C3u	65.9	1.89	1.88	sim	41u
R5P1 I5 U	R5C4u	260.5	2.05	1.89	sim	42u
R5P1 I12 U	R5C5u	697.6	2.14	2.27	sim	43u
R6P3 I1 U	R6C2u	133.0	1.84	1.91	sim	45u
R6P3 I2 U	R6C3u	1477.0	1.82	1.29	sim	46u
R6P3 I18 U	R6C4u	97.7	1.88	1.82	sim	47u
R6P4 I20 U	R6C5u	164.7	1.79	1.48	sim	48u
R6P8 I12 U	R6C6u	43.6	1.84	1.87	sim	49u
R6P9 I14 U	R6C7u	315.8	1.93	1.33	sim	50u
R7P1 I2 U	R7C1u	1133.1	1.86	1.07	sim	51u
R7P1 I3 U	R7C2u	537.6	1.94	1.32	sim	52u
R7P2 I1 U	R7C3u	1103.3	1.90	1.28	sim	53u
R7P2 I3 U	R7C4u	889.5	1.98	1.61	sim	54u
R7P3 I1 U	R7C5u	932.7	1.92	1.36	sim	55u
R7P3 I2 U	R7C6u	174.2	1.42	0.64	sim	56u
R7P4 I1 U	R7C7u	113.0	1.90	2.28	sim	57u
R7P5 I2 U	R7C8u	302.7	2.01	2.35	sim	58u
R7P5 I3 U	R7C9u	191.4	1.87	2.23	sim	59u
R7P6 I1 U	R7C10u	223.3	1.88	2.21	sim	60u
R7P6 I2 U	R7C11u	22.7	1.90	2.13	-	61u
R7P7 I3 U	R7C12u	75.7	1.88	2.13	-	62u
R7P9 I1 U	R7C13u	258.1	1.83	1.68	sim	63u
R7P10 I3 U	R7C14u	1027.5	1.92	1.18	sim	64u
R7P10 I4 U	R7C15u	77.1	1.80	1.43	sim	65u
R8P1 I3 U	R8C1u	87.8	1.87	1.92	sim	66u
R8P2 I3 U	R8C2u	71.5	1.87	1.68	-	67u
R8P3 I1 U	R8C3u	79.9	1.83	1.97	sim	68u
R8P3 I3 U	R8C4u	833.1	1.32	0.57	sim	69u
R8P6 I3 U	R8C5u	97.9	1.87	1.48	sim	70u
R8P6 I4 U	R8C6u	234.2	1.78	1.25	sim	71u
R8P7 I3 U	R8C7u	11.3	1.43	0.46	-	72u
R8P8 I2 U	R8C8u	591.5	1.83	1.51	sim	73u
R8P9 I2 U	R8C9u	613.7	2.0	1.58	sim	74u
R8P10 I1 U	R8C10u	58.9	1.59	0.72	-	75u
R9P11 I4 U	R9C1u	276.10	1.81	1.62	sim	76u

R9P11 I4.1U	R9C2u	276.11	1.82	1.46	sim	77u
R9P11 I5 U	R9C3u	276.12	1.85	1.87	sim	78u
R9P11 I7 U	R9C4u	112.7	1.70	0.97	sim	79u
R10P7 I2 U	R10C1u	460.1	1.85	1.85	sim	80u
R10P7 I4 U	R10C2u	1087.5	2.04	1.76	sim	81u
R10P8 I1 U	R10C3u	40.8	1.86	1.90	-	82u
R10P8 I4 U	R10C4u	450.3	1.85	1.86	sim	83u
R10P9 I1 U	R10C5u	409.4	1.88	2.39	sim	84u
R10P10 I4 U	R10C6u	660.9	2.04	1.71	sim	85u
R10P10 I6 U	R10C7u	129.7	1.84	1.82	sim	86u
R10P10 I7 U	R10C8u	153.3	2.02	1.85	sim	87u
R11P2 I2 U	R11C1u	437.0	1.99	1.62	sim	88u
R11P3 I2 U	R11C2u	12.5	1.73	1.14	sim	89u
R11P3 I3 U	R11C3u	256.4	1.61	0.79	sim	90u
R11P7 I2 U	R11C4u	45.2	1.85	1.92	sim	91u
R11P9 I1 U	R11C5u	124.3	1.79	1.34	sim	92u
R12P1 I3 U	R12C1u	156.8	1.78	1.38	sim	93u
R12P1 I4 U	R12C2u	111.0	1.79	1.48	sim	94u
R12P2 I4 U	R12C3u	396.5	1.88	2.01	sim	95u
R12P3 I1 U	R12C4u	39.7	1.80	1.43	-	96u
R12P4 I4 U	R12C5u	402.7	1.90	1.97	sim	97u
R12P5 I4 U	R12C6u	498.2	1.86	1.73	sim	98u
R12P5 I5 U	R12C7u	200.8	1.82	1.77	sim	99u
R12P9 I1 U	R12C8u	738.3	1.85	1.83	sim	100u

Fonte: Autora (2026) Legenda: A planilha apresenta as informações referentes às amostras utilizadas neste estudo, após serem submetidas ao procedimento de fingerprinting com o primer (GTG)<sub>s</sub>. As letras adicionadas às identificações indicam a estação correspondente: "s" = estação seca, "u" = estação úmida. Assim, a presença de "s" ou "u" após o código auxilia na distinção imediata da origem temporal da amostra. A coluna "Identificação" corresponde ao código original atribuído aos isolados no momento da coleta, organizado de acordo com os 10 pontos de amostragem distribuídos ao longo do curso d'água, conforme descrito na metodologia. Como cada ponto gerou diversos isolados bacterianos, a identificação original reflete essa estrutura hierárquica (ex.: 1.1, 1.2, 1.3, etc.). A coluna "Nova Identificação" foi atribuída para identificar os vários isolados provenientes de um mesmo Rio. A coluna "ng/μL" apresenta a quantificação do DNA obtido após as extrações, enquanto as colunas "A260/A280" e "A260/A230" indicam os índices de pureza do DNA, parâmetros essenciais para avaliar a qualidade das amostras antes das análises moleculares. A coluna "Selecionada" indica se a amostra foi incluída entre as 80 escolhidas em cada estação (seca e úmida) para compor o conjunto final utilizado nas análises posteriores, com base na combinação entre representatividade do ponto de coleta, concentração adequada de DNA e pureza satisfatória. Por fim, a coluna "Código DNA" corresponde ao novo código atribuído a extração de DNA. Essa nova identificação foi realizada para padronizar e garantir melhor visualização para as etapas subsequentes da análise molecular.

## ANEXOS

ANEXO A - Genes de fatores de virulência de patótipos entéricos <i>de E. coli</i> : colonização, aptidão, toxinas e efetores.			
Class	Virulence Factor	Activity/Function	Pathotype
Colonization	bfp	adesão,	EPEC
	eae	fixação e apagamento do enterócito,	EPEC, EHEC
	tir	receptor de intimina translocado,	EPEC, EHEC
	lifA	ligação inicial aos enterócitos,	EPEC
	csgA	fímbrias curli,	EPEC, EHEC
	fimA	fímbrias tipo I,	EPEC, EHEC, DAEC
	fimH	fímbrias tipo I,	EPEC, AIEC
	bcsA	estrutura da celulose,	EPEC
	eha	formação de biofilme,	EHEC
	saa	formação de biofilme,	EHEC
	sab	formação de biofilme,	EHEC
	toxB	estabelecimento de biofilme e adesão,	EHEC
	nleB	formação de biofilme,	EHEC
	nleE	formação de biofilme,	EHEC
	nleH	formação de biofilme,	EHEC
	bleG	formação de biofilme,	EHEC
	lfp	fímbrias polares longas, fixação inicial,	EHEC
	CFA/I	fator de colonização,	EPEC
	CFA/II	fator de colonização,	EPEC
	CFA/IV	fator de colonização,	EPEC
	CS1-6	colonização (antígeno de superfície coli),	EPEC
	etpA	anexo inicial,	EPEC
	aggR	apego e adesão,	EAEC
	aggA	fímbria de adesão agregativa,	EAEC
aafA	fímbria de adesão agregativa,	EAEC	
agg3A	fímbria de adesão agregativa,	EAEC	

ANEXO A - Genes de fatores de virulência de patótipos entéricos <i>de E. coli</i> : colonização, aptidão, toxinas e efetores.			
Class	Virulence Factor	Activity/Function	Pathotype
	agg4A	fímbria de adesão agregativa,	EAEC
	agg5A	fímbria de adesão agregativa,	EAEC
	aap	dispersina, dispersão de EAEC,	EAEC
	afaA-E	Adesinas Afa/Dr, secreção de IL-8,	DAEC
	DraA-E	rearranjo do citoesqueleto, destruição de microvilosidades, adesinas Afa/Dr, secreção de IL-8, expressão de MICA	DAEC
	daaA-E	rearranjo do citoesqueleto, destruição de microvilosidades, adesinas Afa/Dr, secreção de IL-8, expressão de MICA	DAEC
	pop	pili tipo I, adesina,	DAEC
Fitness	sdiA	sinalização de detecção de quorum,	EPEC
	iutA	síntese de aerobactina,	EIEC
	iucB	receptor de ferro sideróforo complexo,	EIEC
	yjaA	proteína de resposta ao estresse polipeptídico,	AIEC
	fyuA	captação de yersiniabactina férrica,	AIEC
	kpsMT II	síntese de cápsulas,	AIEC
Toxins	stx1	toxina shiga, localização de superfície da nucleolina e efeito citotóxico,	EHEC
	stx2	toxina shiga, localização de superfície da nucleolina e efeito citotóxico,	EHEC
	estA	Toxina ST I, diarreia aquosa e secretora, secreção de quimiocinas e citocinas,	ETEC
	estB	Toxina ST II, diarreia aquosa e secretora, secreção de quimiocinas e citocinas,	ETEC
	LT I	diarreia aquosa,	ETEC
	LT II	diarreia aquosa,	ETEC
	eatA	INUNDAÇÃO,	ETEC, EIEC
	astA	toxina enteroagregativa termoestável, diarreia secretora,	ETEC, EAEC, DAEC
	ShET1	enterotoxina shigella 1, atividade intestinal secreta,	ETEC

ANEXO A - Genes de fatores de virulência de patótipos entéricos <i>de E. coli</i> : colonização, aptidão, toxinas e efetores.			
Class	Virulence Factor	Activity/Function	Pathotype
	ShET2	enterotoxina 2 de shigella, atividade intestinal secreta,	EPEC
	pet	SPATE, toxina codificada por plasmídeo, induzindo extrusão de células epiteliais, entrada de células hospedeiras,	EAEC, DAEC
	pic	SPATE, expressão de ShET1, induzindo extrusão de células epiteliais, atividade mucolítica,	EIEC, EAEC
	sigA	SPATE, citotoxina, acúmulo de fluido intestinal,	EIEC, EAEC, DAEC
	sat	SPATE, toxina autotransportadora secretada, prejudicando a junção estreita, mediando a autofagia,	EAEC, DAEC
	sepA	enterotoxina extracelular de shigella, citotoxina, homólogo semelhante à protease IgA,	EAEC
	hlyE	toxina alfa-hemolisina,	EAEC
Effectors	espA	estruturas translocadoras de T3SS, pili comum de <i>E. coli</i> ,	EPEC, ETEC
	espB	estruturas translocadoras do T3SS, inibição da fagocitose,	EPEC
	espC	clivagem das estruturas translocadoras do T3SS,	EPEC
	espD	estruturas translocadoras do T3SS,	EPEC
	espF	morte mitocondrial, ruptura de junções estreitas, evasão imunológica, morte de células hospedeiras,	EPEC, EHEC
	espH	inibição da fagocitose,	EPEC
	espJ	inibição da fagocitose, formação de biofilme,	EPEC, EHEC
	espP	clivagem das estruturas translocadoras do T3SS,	EPEC, DAEC
	espT	morte da célula hospedeira,	EHEC
	MAP	interromper a funcionalidade da membrana mitocondrial, morte da célula hospedeira,	EPEC
	nleA	ativação do inflamossomo, ruptura de junções estreitas, inibição da secreção de citocinas,	EPEC
	etp	Proteína autotransportadora,	ETEC
	tolC	secreção de toxinas ST,	ETEC

ANEXO A - Genes de fatores de virulência de patótipos entéricos <i>de E. coli</i> : colonização, aptidão, toxinas e efetores.			
Class	Virulence Factor	Activity/Function	Pathotype
	nleF	morte da célula hospedeira, ativação do inflamossomo,	EPEC, EHEC
	cif	interrupção do ciclo celular, atrasa a apoptose,	EPEC
	ipaA	Efector tipo III, reorganização do citoesqueleto, bloqueio da morte celular,	EIEC
	ipaB	Efector tipo III, adesão, escape do fagossomo, renovação celular,	EIEC
	ipaC	Efector tipo III, adesão, polimerização de actina, escape de fagossomo,	EIEC
	ipaD	Efector tipo III, adesão, escape do fagossomo, bloqueio da morte celular,	EIEC
	ipaH	amortecer as respostas inflamatórias, invasão,	EIEC, AIEC
	ipaJ	inibição da membrana de tráfego da célula hospedeira, inibição dos inflamossomas,	EIEC
	ipgB1	reorganização do citoesqueleto, formação de babados,	EIEC
	ipgD	reorganização do citoesqueleto,	EIEC
	virA	reorganização do citoesqueleto, bloqueio da morte celular, inibição da autofagia,	EIEC
	virB	síntese do gene do fator de virulência,	EIEC
	virF	expressão gênica do fator de virulência,	EIEC
	virG	Nucleação de actina,	EIEC
	ospB	amortecer as respostas inflamatórias,	EIEC
	ospE	descolamento celular,	EIEC
	ospF	amortecer as respostas inflamatórias,	EIEC
	ospG	amortecer as respostas inflamatórias,	EIEC
	ospI	amortecer as respostas inflamatórias,	EIEC
	ospZ	amortecer as respostas inflamatórias,	EIEC
	icsB	inibição da autofagia,	ETEC
	aaiA-Y	sistema de secreção tipo VI (T6SS),	EAEC
	ibeA	proteína de invasão ibeA,	AIEC

ANEXO A - Genes de fatores de virulência de patótipos entéricos *de E. coli* : colonização, aptidão, toxinas e efetores.

<b>Class</b>	<b>Virulence Factor</b>	<b>Activity/Function</b>	<b>Pathotype</b>
	aaiA-Y	sistema de secreção tipo VI (T6SS),	EAEC

Fonte: Adaptado de PAKBIN *et al* (2021).