



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



NAYARA KASTEM SCHARLACK

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO DE COALHO
COMERCIALIZADO NO INTERIOR DE SÃO PAULO E
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)**

LIMEIRA
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



NAYARA KASTEM SCHARLACK

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO DE COALHO
COMERCIALIZADO NO INTERIOR DE SÃO PAULO E
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)**

*Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutora em Ciências da
Nutrição e do Esporte e Metabolismo na
área de Ciências Nutricionais e
Metabolismo.*

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Moreira Simabuco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA NAYARA KASTEM SCHARLACK, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES

LIMEIRA
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

Sch17 Scharlack, Nayara Kastem, 1991-
Qualidade microbiológica de queijo de coalho comercializado no interior de São Paulo e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) / Nayara Kastem Scharlack. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Adriane Elisabete Antunes de Moraes.

Coorientador: Fernando Moreira Simabuco.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Micro-organismos patogênicos. 3. Inocuidade dos alimentos. I. Moraes, Adriane Elisabete Antunes de, 1975-. II. Simabuco, Fernando Moreira, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Microbiological quality of coalho cheese marketed in the interior of São Paulo and phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates

Palavras-chave em inglês:

Staphylococcus aureus

Pathogenic microorganisms

Food safety

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriane Elisabete Antunes de Moraes [Orientador]

Augusto Ducati Luchessi

Evandro Leite de Souza

Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Fernanda Bovo Campagnollo

Data de defesa: 21-03-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4072-6135>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/7427366111058418>

Folha de Aprovação

Autora: Nayara Kastem Scharlack

Título: Avaliação da qualidade microbiológica de queijo coalho e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

Natureza: Tese

Área de Concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 21 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Fernanda Bovo Campagnollo
Fundação Hermínio Ometto – FHO Uniararas

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais João Carlos, Ivanilza, minha irmã Natália e a minha
amada tia Ivani (in memorian).*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, por me guiar e me fortalecer para que eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida. Agradeço aos meus pais, por serem a minha base e o meu ponto de apoio, à eles devo tudo que sou! A minha irmã Natália, a minha pequena e tão amada sobrinha Lídia e a todos meus familiares que nos momentos de ausência e exaustão da escrita, souberam me compreender e sempre tiraram de mim o meu melhor sorriso e renovaram as minhas forças. Agradecimento em especial a minha tia e madrinha Ivani (*in memorian*) que com grande tristeza a perdi bem no finalzinho dessa jornada, mas sei que por onde estiver, está orgulhosa e vibrando por mais essa conquista, obrigada por tudo tia!!! Agradeço também ao meu namorado Guilherme que é meu ponto de calma em meio ao meu “terremoto”, obrigada por sempre me apoiar, me incentivar e por todos os conselhos e ajuda ao longo destes quatro anos de doutorado.

Agradeço a minha orientadora Adriane, pela oportunidade, por acreditar em mim e depositar a confiança necessária para a execução deste trabalho, obrigada por me acolher tão bem desde o nosso primeiro encontro! Também aqui cabe o agradecimento especial ao meu co-orientador Fernando, que me recebeu de braços abertos ao LabMas e me deu todo o suporte para as análises moleculares. Agradecimento especial a pós doutoranda, Roberta, por toda a ajuda e pela valiosa troca de conhecimento. Agradeço aos meus colegas do LLPP, LabMas e Labmex por todo o suporte, pela parceria e pelas conversas que confortavam nossos corações e clareavam as nossas incertezas.

Agradeço também a Fundação Hermínio Ometto (FHO) e toda a direção da instituição pela utilização de seu espaço físico para a execução de partes desse projeto, e aos meus alunos de IC, pela paciência e compreensão dos meus “sumiços” repentinos (rsrs).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

Theodore Roosevelt.

RESUMO

Nos últimos anos observou-se a melhora da qualidade microbiológica de alguns produtos. Ainda assim, o leite e seus derivados devem continuar sendo alvo de vigilância constante devido ao risco de veiculação de patógenos de grande risco sanitário. Os queijos merecem atenção especial neste contexto, especialmente pela possibilidade de emprego de leite cru ou por falhas na pasteurização e/ou nas boas práticas de produção. O queijo coalho, é um produto tipicamente nordestino e é conhecido em todo território nacional. Dentre os microrganismos patogênicos que representam risco em potencial para esse produto, o *Staphylococcus aureus* merece atenção por estar frequentemente presente. O referido microrganismo pode ser responsável por quadros de intoxicações alimentares, produção de biofilme e algumas cepas apresentam alta resistência aos antibióticos, como as resistentes à meticilina (conhecidas pela sigla MRSA – *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos de coalho industrial, caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de *Staphylococcus aureus* quanto a presença dos genes *femA*, *mecA*, *blaZ*, *sea* e *sed*, além de avaliar a capacidade *in vitro* de formação de biofilme e de resistência à antibióticos. Para isso, foram adquiridas quatro marcas industriais de queijo de coalho comercializado nas redes de supermercado do interior de São Paulo, e de cada marca, foram analisadas cinco amostras do mesmo lote, realizando a análise representativa das marcas comerciais, totalizando 20 amostras. Os resultados deste trabalho demonstram que todas as marcas avaliadas estavam de acordo com a legislação quanto aos parâmetros microbiológicos. A resistência frente aos antibióticos β -lactâmicos foi avaliada pelo teste fenotípico, no qual todos os isolados provenientes da marca industrial B apresentaram resistência à oxacilina e cefoxitina (44,8%), compatível com o teste molecular, no qual os mesmos isolados positivaram para os genes *mecA* e *blaZ*. O gene codificador da enterotoxina (*sea* e *sed*) não foi observado em nenhum dos isolados, entretanto, uma investigação mais aprofundada de outros genes relacionados à intoxicação alimentar se faz necessária. Quando analisado a capacidade de formação de biofilme, observou-se que os isolados da marca industrial B e os isolados dos queijos artesanais E e F apresentaram fraca capacidade de formação de biofilme. Embora a contagem de *S. aureus* dos queijos comerciais esteja de acordo com a legislação, a presença de genes de resistência contra a classe dos beta-lactâmicos e a capacidade de produção de biofilmes é preocupante para a comunidade. Assim, o cuidado no manejo dos animais, ordenha do leite, boas práticas de fabricação dos queijos, adequado armazenamento e consumo dentro do prazo de validade podem representar uma barreira à resistência microbiana horizontal e prevenir intoxicações alimentares.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, avaliação microbiológica, microrganismos patogênicos, resistência antimicrobiana, segurança dos alimentos, queijo coalho, biofilme.

ABSTRACT

In recent years there has been an improvement in the microbiological quality of some products. Even so, milk and its derivatives must continue to be the target of constant surveillance due to the risk of transmitting pathogens of great health risk. Cheeses deserve special attention in this context, especially due to the possibility of using raw milk or due to failures in pasteurization and/or good production practices. Coalho cheese is a typically northeastern product and is known throughout the national territory. Among the pathogenic microorganisms that represent a potential risk for this product, *Staphylococcus aureus* deserves attention because it is frequently present. This microorganism may be responsible for food poisoning, biofilm production and some strains are highly resistant to antibiotics, such as methicillin-resistant strains (known by the acronym MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Therefore, the objective of this work was to evaluate the microbiological quality of industrial coalho cheese, phenotypically and genotypically characterize the *Staphylococcus aureus* isolates regarding the presence of the *femA*, *mecA*, *blaZ*, *sea* and *sed* genes, in addition to evaluating the in vitro capacity of biofilm formation and antibiotic resistance. For this, four industrial brands of coalho cheese sold in supermarket chains in the interior of São Paulo were purchased, and for each brand, five samples from the same lot were analyzed, performing the analysis representative of the commercial brands, totaling 20 samples. The results of this work demonstrate that all evaluated brands were in accordance with the legislation regarding microbiological parameters. Resistance to β -lactam antibiotics was evaluated by the phenotypic test, in which all isolates from industrial brand B showed resistance to oxacillin and cefoxitin (44.8%), compatible with the molecular test, in which the same isolates were positive for the *mecA* and *blaZ* genes. When analyzing the ability to form a biofilm, it was observed that the isolates from the industrial brand B and the isolates from artisanal cheeses E and F had a weak ability to form a biofilm. Although the count of *S. aureus* in commercial cheeses complies with the legislation, the presence of resistance genes against the beta-lactam class and the ability to produce biofilms is a matter of concern for the community. Thus, careful handling of animals, milking, good cheese manufacturing practices, adequate storage and consumption within the expiration date may represent a barrier to horizontal microbial resistance and prevent food poisoning.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, microbiological evaluation, pathogenic microorganisms, antimicrobial resistance, food safety, coalho cheese,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais estados produtores de queijos (NASCIMENTO, 2017).....	22
Figura 2. Principais municípios produtores de queijo de coalho no Estado da Paraíba	23
Figura 3. Etapas do processo de produção do queijo coalho (NASSU et al., 2006).	24
Figura 4. Distribuição dos alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil, entre os anos de 2012 a 2021. Fonte: Adaptado de Brasil (2022).	27
Figura 5. Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA no Brasil, entre os anos de 2012 a 2021. Fonte: Brasil (2022).	27
Figura 6. Alimentos mais comuns implicados em doenças transmitidas por alimentos por <i>Salmonella</i> ssp por categoria de alimentos nos Estados Unidos, 2009-2018 (Adaptado de White et al. 2022).....	29
Figura 7. Estrutura química do anel β -lactâmico (ARAUJO et al., 2020).	35
Figura 8. Estrutura molecular dos antibióticos β -lactâmicos. (A) Penicilina, (B) Cefalosporina, (C) Carbapenêmico (D), Monobactâmico (ARAUJO et al., 2020).	36
Figura 9. Ciclo de desenvolvimento do biofilme (KONING, 2010). Etapa 1, processo de aderência do microrganismo; Etapa 2, formação de microcolônias; Etapa 3, formação do biofilme; Etapa 4, maturação do biofilme; Etapa 5, desprendimento do biofilme.	38
Figura 10. Mecanismos de resistência antimicrobiana. A resistência antimicrobiana pode se espalhar por múltiplas vias diretas e caminhos indiretos para humanos e animais de produção (setas) (adaptado de Woolhouse e Ward, 2013).	42
Figura 11. Mecanismos de difusão de MRSA em ambiente comunitário, hospitalar e em animais de alimentação (Autoria Própria).	42
Figura 12. Representação de NMP/g para a estimativa de <i>Staphylococcus</i> ssp em queijos industriais (Autoria Própria).	63
Figura 13. Provas bioquímicas para identificação de <i>S. aureus</i> dos isolados de queijos (a)→ colônia característica de <i>S. aureus</i> ; (b) prova da catalase; (c) fermentação do manitol; (d) prova da coagulase (Autoria Própria).	68
Figura 14. Teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão.	80
Figura 15. Detecção do gene <i>femA</i> (amplicon 132pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	85
Figura 16. Detecção do gene <i>femA</i> (amplicon 132pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	85
Figura 17. Perfil de sensibilidade e resistência dos isolados <i>S. aureus</i> em queijos, frente aos antibióticos	82
Figura 18. Detecção do gene <i>mecA</i> (amplicon 533pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	90
Figura 19. Detecção do gene <i>mecA</i> (amplicon 533pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	90
Figura 20. Detecção do gene <i>blaZ</i> (432pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	91

Figura 21. Detecção do gene <i>blaZ</i> (432pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	91
Figura 22. Detecção do gene <i>sea</i> (amplicon 127pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.....	94
Figura 23. Detecção do gene <i>sea</i> (amplicon 127pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	94
Figura 24. Detecção do gene <i>sed</i> (amplicon 317pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	95
Figura 25. Detecção do gene <i>sed</i> (amplicon 317pb) para os isolados de <i>S. aureus</i> dos queijos artesanais (E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.	95
Figura 26. Capacidade de produção de biofilme – teste in vitro, dos isolados de <i>S. aureus</i> de queijos industriais e artesanais.....	98
Figura 27. Quantificação de DNA das bactérias totais em amostras de queijo. PCR em tempo real foi realizada com DNA extraído das amostras. *demonstra diferença significativa $p<0,05$ utilizando teste ANOVA.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de leite sob inspeção no Brasil, por região produtora (mil/litros)	20
Tabela 2. Origem e característica dos principais tipos de queijos	21
Tabela 3. Série de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos de 2012 a 2019	26
Tabela 4. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tabela 5. Componentes do biofilme.....	38
Tabela 6. Média do Teor de Umidade (%) e Atividade de água (A_w) das quatro marcas de queijo coalho industrial (A, B, C e D) e das amostras artesanais (E e F).....	65
Tabela 7. Pesquisa microbiológica das cinco unidades amostrais de queijo coalho industrial identificada como A, B, C e D.....	69
Tabela 8. Pesquisa microbiológica das amostras de queijo coalho artesanal identificada como E e F	70
Tabela 9. Halos de interpretação do teste TSA	79
Tabela 10. Iniciadores de PCR para amplificação de genes <i>mecA</i> e <i>blaZ</i>	81
Tabela 11. Iniciadores de PCR para amplificação de genes <i>sea</i> e <i>sed</i>	82
Tabela 12. Sequência de nucleotídeos dos primers e tamanhos esperados dos amplicons para análise quantitativa de bactérias totais	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Histórico do queijo e da produção do queijo de coalho	19
2.2 Microrganismos patogênicos em queijos	25
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.4 Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)	33
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e a resistência aos antibióticos	34
2.6 Produção de biofilmes	37
2.7 Integração entre a saúde humana, saúde animal e ambiente	40
2.8 Referência bibliográfica	43
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos	58
4. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COALHO INDUSTRIAL	60
4.1 Metodologia	61
4.1.1 Obtenção e identificação das amostras	61
4.1.2 Avaliação da atividade de água	61
4.1.3 Avaliação do teor de umidade	61
4.1.4 Enumeração de <i>Escherichia coli</i>	62
4.1.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> ssp.	62
4.1.6 Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.1.7 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	64
4.1.8 Análise estatística	64
4.2 Resultados e discussão	65
4.2.1 Caracterização do queijo coalho - teor de umidade e atividade de água	65
4.2.2 Análise microbiológica do queijo coalho	67
4.3 Conclusão	72
4.4 Referência bibliográfica	73
5. CAPÍTULO 2: GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> OBTIDOS DE QUEIJO COALHO	77
5.1 Metodologia	78
5.1.1 Obtenção dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	78
5.1.2 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana	79
5.1.3 Extração de DNA	80
5.1.4 Detecção de genes de resistência por PCR	80
5.1.5 Avaliação dos genes codificadores de enterotoxina estafilocócica	81
5.1.6 Capacidade de formação de biofilmes – teste quantitativo in vitro	82
5.1.7 Análise quantitativa de bactérias totais	83
5.1.8 Análise estatística	83
5.2 Resultados e discussão	84
5.2.1 Confirmação dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	84
5.2.2 Análise genotípica dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> (gene <i>femA</i>)	84

5.2.3	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana.....	86
5.2.4	Genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos.....	89
5.2.5	Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas	93
5.2.6	Capacidade de formação de biofilme in vitro	97
5.2.7	Análise quantitativa de bactérias totais	100
5.3	Conclusão	103
6.	DISCUSSÃO GERAL – CAPÍTULO I E CAPÍTULO II.....	104
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
8.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	108
9.	ANEXO.....	116

1. INTRODUÇÃO

Desenvolvido aproximadamente há 8.000 anos, o queijo é considerado um dos produtos lácteos mais consumidos e ricos nutricionalmente, sendo fonte de proteínas, cálcio, vitamina A, ácido linoleico, linolênico e araquidônico (KAHRAMAN *et al.*, 2010), e seu estudo ganhou destaque nos últimos anos (ABIQ, 2021).

O queijo tipo coalho (também chamado simplesmente de queijo coalho) é um produto tipicamente nordestino, mas que vem sendo produzido em todo o território nacional, tanto em escala industrial - com avançadas tecnologias e alto volume de produção - quanto de forma artesanal com uso limitado de tecnologias e baixo volume de produção, como pequenas queijarias urbanas e fazendas rurais (DUARTE *et al.*, 2005; SEBRAE, 2008).

Utilizando de baixa tecnologia, a produção artesanal do queijo coalho acarreta em menor rigidez no controle de qualidade, tornando a qualidade microbiológica deste produto duvidoso, podendo se tornar uma via de transmissão de bactérias patogênicas (NASSU *et al.*, 2006; EVENCIO-LUIZ *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2021). O queijo coalho artesanal pode ser elaborado tanto a partir de leite pasteurizado como de leite cru, havendo necessidade de adequado controle de qualidade (NASSU *et al.*, 2006, MACHADO *et al.*, 2020).

A preocupação com a presença de microrganismos patogênicos em queijo coalho como bactérias do grupo coliformes termotolerantes, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é relatado por diversos autores como Mendes (2011), Nunes (2017), Mehli *et al.*, (2017), Johler *et al.*, (2018), Shibata (2018), Filho e Filho (2000) e Lehotová *et al.* (2021), sendo que a presença de tais bactérias, podem ser responsáveis por quadros de doença transmitidas por alimentos (DTA).

É considerado surto de DTA quando duas ou mais pessoas após a ingestão de alimento e/ou água contaminados provenientes do mesmo local, apresenta sintomas semelhantes, e sua ocorrência pode estar associada a diversas situações como: alimentos contaminados, falha na higiene pessoal do manipulador, saneamento básico precário e água inapropriada para consumo humano (BRASIL, 2023). Por essas razões, a incidência de DTA é maior em regiões e países subdesenvolvidos, e em populações de baixa renda (AMARAL *et al.*, 2021).

Segundo o boletim epidemiológico de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) no Brasil no período 2016 a 2019, foram notificados 2.504 surtos, acometendo um total de 37.247 pessoas e registrando 38 óbitos. Entre os 541 surtos identificados, 35,7% tiveram como o agente etiológico *Escherichia coli*, 14,9% *Salmonella*, 11,5% *Staphylococcus aureus*, 8,3% Norovírus, 7,4% *Bacillus cereus* e 6,9% Rotavírus, entre outros (BRASIL, 2020).

Dentre os microrganismos patogênicos citados, o *S. aureus* é um dos que apresenta riscos de contaminação eminente em produtos lácteos, uma vez que este microrganismo pode desencadear o quadro infeccioso denominada mastite estafilocócica nos rebanhos leiteiros (KLUYTMANS, 2010; MENEZES *et al.*, 2015, SONG *et al.*, 2020). A mastite estafilocócica se caracteriza pela intensa inflamação tecidual, onde o microrganismo adentra a mucosa através de rupturas de pele, lesões ou incisões cirúrgicas e produzem enzimas e toxinas, desencadeando dano tecidual grave e formação de abscessos (VASILEIOU *et al.*, 2019).

Além disso, o quadro infeccioso é responsável por gerar prejuízos para os produtores de leite e derivados lácteos, sendo que os danos econômicos vão desde gastos com medicamentos até o descarte do leite contaminado (FONSECA *et al.*, 2021). Contudo, o leite de descarte é comumente empregado para a alimentação de bezerros, devido a proibição legal de sua comercialização para dieta humana (NASCIMENTO, 2022). Todavia, segundo Penati *et al.* (2021), o oferecimento de leite de descarte não pasteurizado aos bezerros, pode influenciar na microbiota intestinal e função do trato gastrointestinal, além de prejudicar o desempenho do animal e favorecer resistência microbiana.

Devido aos problemas e prejuízos econômicos acarretados aos produtores, os rebanhos acometidos por mastite necessitam de medidas de controle como adequação do ambiente, manejo correto de dejetos, manutenção e higienização dos equipamentos envolvidos na ordenha (WERNER *et al.*, 2010).

Os cuidados que englobam o manejo e a ordenha do animal refletem a qualidade da matéria prima, pois o leite desejado é aquele obtido de animais sadios e bem nutridos. A ordenha pode ser realizada de forma manual, ou utilizando o emprego de tecnologias, contudo, de ambas as formas, é realizado previamente o pré *dipping* dos animais, que se trata de um processo de antissepsia dos úberes do rebanho leiteiro, utilizando solução de iodo, clorexidina ou cloro, e posteriormente, realizado o pós *dipping*, no qual utiliza-se solução antisséptica iodada e glicerina após a

ordenha (BELOTI *et al.*, 2012). Porém, nem sempre essas medidas são eficientes para evitar infecções, fazendo-se necessário por muitas vezes, a administração de antibióticos intramamários ou intramusculares (BLAIR *et al.*, 2015; PIERI *et al.*, 2020).

A antibioticoterapia auxilia a medicina moderna, melhorando e aumentando a qualidade e expectativa de vida, e sua utilização é datada desde 1940 para o tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos (ALVES *et al.*, 2021). O tratamento com uso de antibióticos é utilizado de acordo com a gravidade do processo infeccioso e pode ser classificado como terapia convencional, terapia estendida e terapia combinada (LANGONI *et al.*, 2017). A terapia convencional consiste na utilização de antibióticos intramamários, variando de 3 a 4 dias e é comumente indicada para microrganismos mais sensíveis; a terapia estendida é indicada para infecções mais crônicas e resistentes, utilizando de 5 a 8 dias; já a terapia combinada compreende a associação de um antimicrobiano intramamário juntamente com um de ação sistêmica (por via intramuscular ou endovenosa), como é necessário no caso de identificação da bactéria *Staphylococcus aureus*, uma vez que esta possui altas taxas de resistência a antimicrobianos, sendo de difícil tratamento (ALVES *et al.*, 2020; LANGONI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2011).

A resistência dos microrganismos frente aos antibióticos aumentou ao longo da emergência sanitária ocasionada pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) (FIOCRUZ, 2021). O uso exacerbado de antibióticos nos hospitais durante a pandemia é apontado como situação alarmante no Brasil e em outros países para o surgimento de novas cepas multirresistentes, agravando ainda mais o cenário mundial e impactando a saúde pública (FIOCRUZ, 2021). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2022), o *S. aureus* está no ranking dos microrganismos mais resistentes a antibióticos. As mutações gênicas que alteram os sítios alvo de ligação são responsáveis pela resistência do microrganismo frente a diversos antibióticos derivados da meticilina, conhecidos como MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (HAABER *et al.*, 2017; FOSTER, 2017; CRAFT *et al.*, 2019).

O MRSA é uma grande preocupação de saúde pública pois apresenta resistência frente aos antibióticos da classe β -lactâmicos atualmente disponível na prática clínica, incluindo as penicilinas, amoxicilina, meticilina, oxacilina e apresenta também resistência aos antibióticos da classe dos cefalosporinas (como por exemplo, cefalexina), além de ser responsável por mais de 70.000 infecções graves e 9.000 mortes por ano nos Estados Unidos (CDC, 2023).

Além da resistência aos antibióticos, o *S. aureus* também possui diversos fatores de virulência como: capacidade de produção de toxinas (SILVA *et al.* 2020) e formação de biofilmes (HAABER *et al.*, 2017), o qual fornece proteção à desidratação às células microbianas, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos e sanitizantes (GILBERT *et al.*, 2003; ARCHER *et al.*, 2011, DEFRANCESCO *et al.*, 2017; CRAFT *et al.*, 2019). Assim sendo, *S. aureus* representa um microrganismo que merece atenção tanto de produtores artesanais de queijos, quanto de produtores em grande escala em indústrias de laticínio. Dessa forma, a avaliação microbiológica envolvendo a qualidade das matérias-primas, assim como dos queijos recém-produzidos e ao longo de sua estocagem, se faz necessário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico do queijo e da produção do queijo de coalho

A produção de alimentos fermentados se desenvolveu a partir da junção das tradições folclóricas dos povos indígenas e das tradições europeias (PENNA *et al.*, 2021), e a produção de queijos brasileiros é fortemente influenciada pelas origens e tradições de países como Dinamarca, Espanha, França, Itália, Portugal e Suíça (AMARANTE, 2015; CARRO, 2017).

Recentemente, o queijo adquiriu papel importante como atração turística surgindo em paralelo ao crescente impacto regional das práticas de turismo alimentar. Como forma de valorizar os produtos locais e resgatar o patrimônio cultural, a fabricação de queijos tornou-se uma atividade significativa para o desenvolvimento comunitário (FUSTÉ-FORNÉ, MUNDET, 2020).

Caracteriza-se como produção artesanal quando a produção do queijo é caracterizada pela ausência de recursos industriais e meios sofisticados, contudo, essa definição não é universal. A divergência do conceito está atrelada entre os produtores do setor queijeiro e as instituições brasileiras, que apoiam o desenvolvimento e o emprego de novas tecnologias (SEBRAE, 2008). Segundo Zuin e Zuin (2008), os alimentos artesanais, também conhecidos como tradicionais, caracterizam a história social e cultural de uma região e são produzidos através da matéria-prima obtida na grande maioria das vezes pelo próprio produtor, proporcionando geração de empregos e desencadeando o crescimento econômico regional.

O mercado de lácteos no Brasil mudou expressivamente no último ano em função dos resquícios da pandemia, como desemprego, redução de renda e o endividamento dos produtores brasileiros (Tabela 1), entretanto, projeções apontam um cenário positivo para a próxima década, com um crescimento de aproximadamente 36% (EMBRAPA, 2022).

Tabela 1. Produção de leite sob inspeção no Brasil, por região produtora (mil/litros)

Regiões	2016	2017	2018	2019	2020	2021	Varição 2021/2020
	23.169.654	24.333.511	24.457.864	25.011.824	25.032.169	24.989.331	-0,2%
N	1.091.490	1.126.978	1.049.343	1.018.353	1.012.630	964.928	-4,7%
NE	1.173.348	1.250.228	1.406.582	1.554.246	1.718.041	1.791.866	4,3%
SE	9.477.376	9.716.754	9.634.543	9.842.681	10.025.000	9.473.176	-5,5%
S	8.431.814	9.118.698	9.203.724	9.323.928	9.746.231	9.805.756	0,6%
CO	2.994.605	3.120.853	3.163.670	3.266.442	3.130.015	2.992.073	-4,4%

Fonte: Adaptado de CONAB (2022). N- Região Norte; NE- Região Nordeste; SE- Região Sudeste; S- Região Sul; CO- Região Centro –Oeste

O setor agropecuário do leite possui papel fundamental na geração de renda do país, pelo fato do leite ser um alimento básico e servir de matéria prima para a produção de outros derivados como queijos, manteiga, leite em pó, iogurtes entre outros (NASCIMENTO, 2017).

Dentre os alimentos artesanais e derivados lácteos, o queijo é o produto mais diversificado e instável em suas características, pois a qualidade do queijo ao longo de sua vida de prateleira sofre influência pela microflora do leite utilizado, atividade das enzimas coagulantes, e das bactérias lácticas iniciadoras que afeta a composição e maturação do queijo (BANSAL, VENNA, 2022). Além disso, as características e qualidade final dos queijos dependem de fatores como condições ambientais, clima, alimentação animal, raça/espécie do rebanho leiteiro, tecnologia empregada na fabricação e a utilização de leite cru (SENOUSSI *et al.*, 2022).

Existem mais de mil variedades de queijos em todo o mundo, com diferentes formas, sabores e aromas, podendo adotar diferentes processos químicos e microbiológicos para sua produção (NASCIMENTO, 2017), variando de acordo com o país que se produz, conforme demonstrado na Tabela 2 (BOUDALIA *et al.*, 2020).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1996), considera-se queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído - integral, parcial ou totalmente desnatado, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade adequada para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Tabela 2. Origem e característica dos principais tipos de queijos

Produto	Origem	Característica principal	Tipo de Leite
Coalho	Brasil	Massa semi-cozida ou cozida, semi-dura e elástica	Cru ou pasteurizado
Minas Frescal	Brasil	Massa crua	Pasteurizado
Muçarela	Itália	Massa semi-dura e fiada	Pasteurizado
Parmesão	Itália	Massa cozida e de salga longa	Pasteurizado
Prato	Brasil	Massa semi-cozida e macia	Cru ou pasteurizado
Requeijão	Brasil	Processado e espalhável	Pasteurizado

Fonte: Adaptado de SEBRAE (2008).

Em termos de gordura, os queijos são subdivididos em extra gordo ou duplo creme, mínimo de 60%; gordo, 45% a 59,9%; semi-gordo, 25% a 44,9%; magro, 10% a 24,9% e desnatado, menos de 10%. De acordo com o conteúdo de umidade, em porcentagem, os queijos classificam-se em: queijo de baixa umidade ou queijo de massa dura, com umidade de até 35,9%; queijos de média umidade ou queijo de massa semidura, com valores entre 36,0 e 45,9%; queijos de alta umidade ou queijo de massa branda, cuja umidade pode variar entre 46,0 e 54,9% e queijos de muita alta umidade ou queijo de massa branda, cuja umidade não seja inferior a 55,0% (BRASIL, 1996).

As características sensoriais dos queijos envolvem as alterações físicas, químicas e microbianas do leite, assim como a transformação enzimática e bioquímica da lactose, proteínas e lipídeos em ácidos orgânicos, sendo que a intensidade dessas transformações está diretamente relacionada com o tempo de maturação (PENNA *et al.*, 2021).

Dentre os queijos produzidos em território nacional e que são conhecidos por carregar consigo as tradições regionais, destacam-se os queijos “marajó”, “manteiga”, “caipira”, “canastra”, “minas” e “coalho” (Figura 1) (SANT'ANNA *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2018; KAMIMURA *et al.*, 2019). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do país, e os alimentos oriundos da região apresentam um sabor peculiar, derivado das características de clima, temperatura, solo e

pastagem. Na região nordeste, os estados de destaque principalmente na produção de queijos de cabra, são produzidos nas regiões de Cariri, Curimataú e Sertão, já no estado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina a produção de queijo Serrano é predominante, envolvendo mais de 3,5 mil estabelecimentos rurais (CHALITA *et al.*, 2009).



Figura 1. Principais estados produtores de queijos (NASCIMENTO, 2017).

No estado da Paraíba, segundo Nascimento (2017), cerca de cinquenta municípios são produtores de queijos coalho, destacando as microrregiões de Catolé do Rocha, Cajazeiras, Souza, Itaporanga, Patos e Piancó (Figura 2). A produção artesanal do queijo coalho representa para a região nordeste, uma atividade relevante para a economia regional, devido a grande demanda de volume de leite, envolvendo pequenos e médios produtores, estimando-se que cerca de 50% de toda a produção de leite de vaca seja destinada para a produção de queijo coalho (CAVALCANTE, 2017).

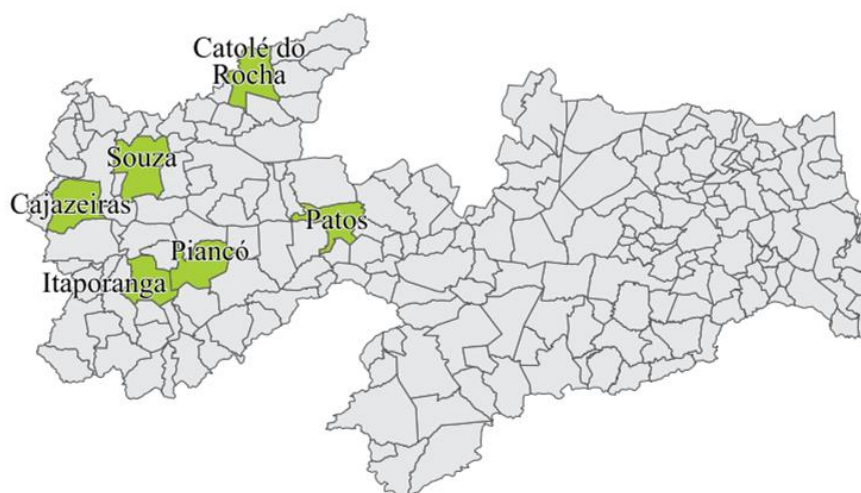


Figura 2. Principais municípios produtores de queijo de coalho no Estado da Paraíba (CAVALCANTE, 2017).

Relatos indicam que a origem do queijo coalho se deu por viajantes nordestinos que ao realizar longas viagens estocavam o leite para o consumo em recipientes feitos de estômago de animais, chamado de matulão (CAVALCANTE, 2017). Ao longo da viagem, o leite coagulava e a massa resultante apresentava sabor apreciado e textura firme. Ao longo dos anos, o modo de fabricação do queijo foi se desenvolvendo, utilizando-se de sacos de pano e prensas de madeira, mantendo a rusticidade e originalidade (ARAUJO *et al.*, 2011).

O processo de fabricação do queijo coalho nordestino é relativamente simples e de baixo custo, utilizando apenas o leite de vaca cru, coalho industrializado e sal sem adição de fermentos lácticos comerciais. Entretanto, devido a sua grande procura, outras regiões como Sudeste e Sul iniciaram a produção, empregando o leite de vaca pasteurizado (MONTEL *et al.*, 2014), fermento láctico, coalho industrializado, cloreto de cálcio e sal (CAVALCANTE, 2017) conforme demonstrado na Figura 3.

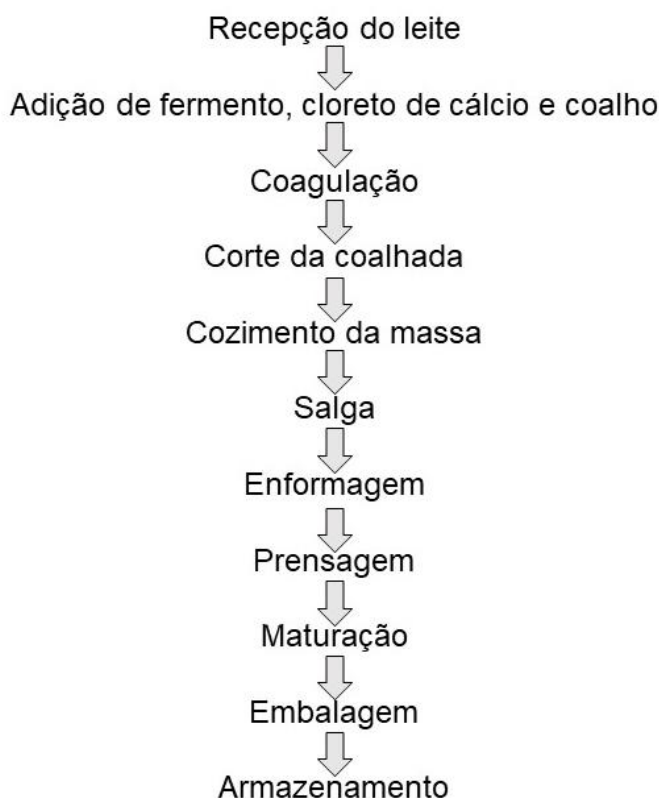


Figura 3. Etapas do processo de produção do queijo coalho (NASSU *et al.*, 2006).

A diferença entre os queijos elaborados com leite cru ou pasteurizado se dá pelas características sensoriais do alimento, como aroma, aspecto, sabor e textura, e pela composição centesimal e qualidade microbiológica, uma vez que na utilização do leite pasteurizado, como o processo térmico inativa as bactérias láticas “nativas”, se faz necessário a reincorporação de culturas de fermento láctico comercial, modificando o sabor original tão apreciado do alimento (MONTEL *et al.*, 2014). Entretanto, a falta de padronização para a produção artesanal e a atividade clandestina no processo de manufatura, faz com que a produção de queijos a partir de leite pasteurizado venha ganhando espaço no país, inclusive na região Nordeste (CAVALCANTE, 2017).

Segundo a Instrução Normativa nº30, de 26 de junho de 2001, considera-se queijo coalho aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias láticas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação, apresentando de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. Geralmente, possui consistência semi-dura e compacta, com aspecto branco

amarelado, ligeiramente ácido e salgado, com forma retangular pesando entre 1,0 a 5,0 kg (CAVALCANTE *et al.*, 2007; SEBRAE, 2008, BRANCO *et al.*, 2003).

O queijo coalho, produto tipicamente nordestino, devido ao seu apreciado sabor, nas últimas décadas ganhou espaço em São Paulo e Rio de Janeiro, onde é comercializado nos principais supermercados e distribuidoras (CAVALCANTE, 2017) e seu consumo pode ser feito sem cozimento, frito ou assado na brasa (COSTA *et al.*, 2020). Um atributo e diferencial do queijo coalho é a capacidade de derreter ou não quando submetido a altas temperaturas. Tal fato pode ser explicado pelo baixo valor de pH e alto teor de umidade, por isso, alguns queijos derretem facilmente em contato com o calor, e outros, mesmo fritos ou assados, se mantêm sólidos (FILHO *et al.*, 2012).

O teor de umidade presente nos queijos, não interfere somente no estado físico do seu preparo, mas também, auxilia no desenvolvimento de microrganismos e consequentemente, diminuição da vida útil do produto (MELO *et al.*, 2020). Durante as etapas de produção, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação por microrganismos patogênicos é indesejável e nociva. A ausência das Boas Práticas de Fabricação (BPF) na manipulação do queijo e da matéria prima, reflete na qualidade microbiológica do produto final, podendo-o tornar um veículo de doença alimentar (SANTOS, 2019).

2.2 Microrganismos patogênicos em queijos

Os anos de inovação e os avanços da tecnologia, ainda não são uma barreira totalmente eficaz para garantir a segurança e qualidade dos alimentos. As doenças ocasionadas pela presença de microrganismos podem ser classificadas em infecção alimentar e intoxicação alimentar, sendo que as infecções são caracterizadas pelo desenvolvimento do microrganismo no corpo humano através da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos infecciosos, e a intoxicação é a doença oriunda do consumo de alimentos contaminados por toxinas microbianas pré-formadas (CHAIDOUTIS *et al.*, 2022). A intoxicação alimentar mais comum é a por contaminação por *Staphylococcus aureus*, afetando mais de um milhão de pessoas a cada ano (WHYTNEY e ROLFES, 2008).

Estudos apontam que aproximadamente 9,4 milhões de DTA ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, e no cenário brasileiro, a maioria dos casos relatados ocorrem em domicílios, restaurantes particulares, refeitórios escolares e que atendem

empresas (WHITE *et al.*, 2022). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2022), o número de surtos relatados do ano 2012 a 2021, sofreu queda considerável nos últimos 48 meses, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Série de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos de 2012 a 2019

Ano	Surtos	Expostos	Doentes	Hospitalizados	Óbitos	Letalidade
2012	863	42.137	14.670	1.623	10	0,07%
2013	861	64.361	17.455	1.893	8	0,05%
2014	886	124.358	15.700	2.524	9	0,06%
2015	673	37.164	10.676	1.453	17	0,16%
2016	538	200.895	9.935	1.406	7	0,07%
2017	598	47.408	9.426	1.439	12	0,13%
2018	597	57.296	8.406	916	9	0,11%
2019	771	17.388	9.586	1.301	10	0,10%
2020	292	10.548	4.600	595	6	0,13%
2021	268	9.129	4.385	296	1	0,02%
Total	6.347	610.684	104.839	13.446	89	0,08%

Fonte: BRASIL (2022).

Embora seja possível observar uma queda no número de DTAs nos anos de 2020 e 2021 (anos de pico da pandemia de COVID-19), dentre 6.347 surtos de DTA, foi possível rastrear os veículos apontados como transmissores de doenças de 2.126 casos, dentre eles: água (25,2%), alimentos mistos (21,2%), doces e sobremesas (9,9%) e leite e derivados (7,1%) entre outros, conforme apresentado na Figura 4. Segundo o boletim epidemiológico, também é possível observar quais foram os agentes etiológicos mais predominantes, sendo eles *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella ssp*, dentre outros (Figura 5) (BRASIL, 2022).

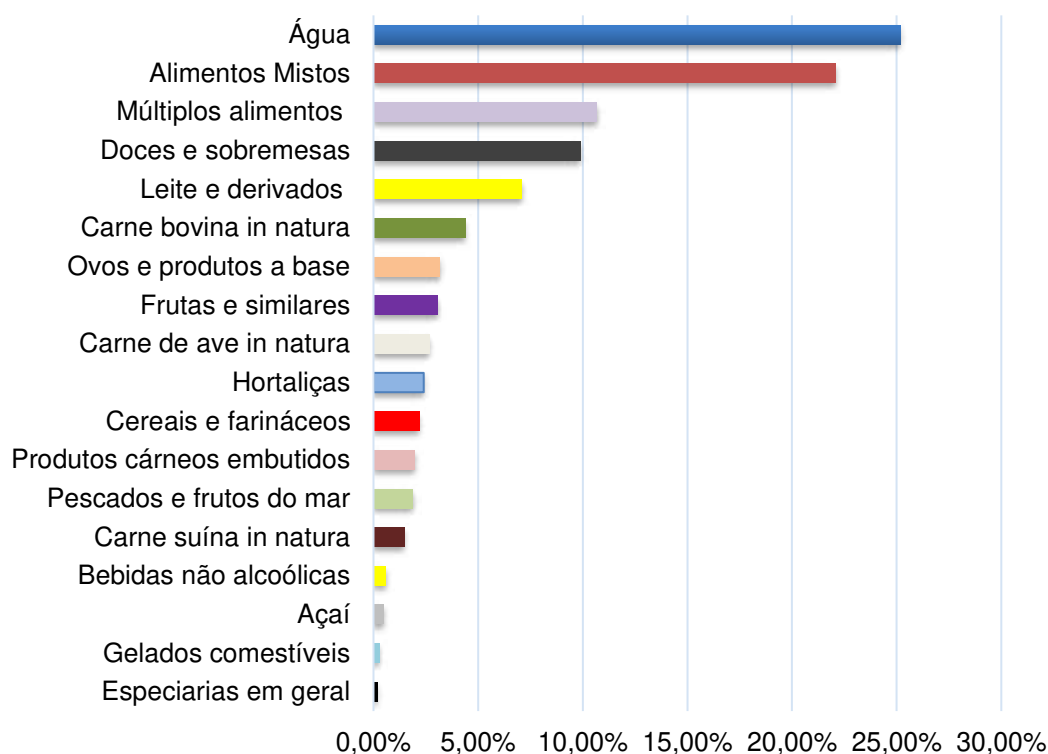


Figura 4. Distribuição dos alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil, entre os anos de 2012 a 2021. Fonte: Adaptado de Brasil (2022).

A presença de microrganismos patogênicos associado a indústria queijeira se dá majoritariamente pela utilização de leite cru no processo de produção do queijo (ROSENGREEN *et al.*, 2010). A preocupação com a qualidade microbiológica do queijo coalho vem sendo relatada em diversos estudos (SANTANA *et al.*, 2008; FREITAS-FILHO *et al.*, 2009, DIAS *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2016).

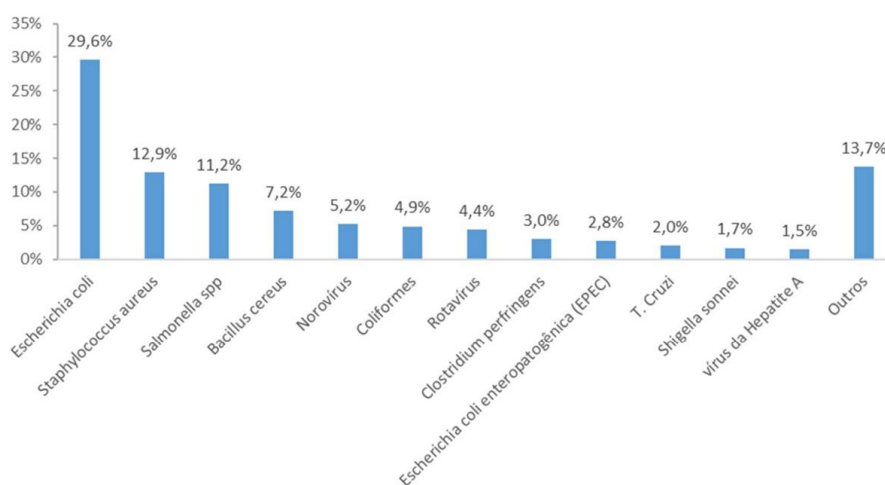


Figura 5. Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA no Brasil, entre os anos de 2012 a 2021. Fonte: Brasil (2022).

A presença da *Escherichia coli* também conhecida como microrganismo termotolerante, com temperatura ótima de crescimento em 44,5°C, indica condições de processamento insatisfatório durante a produção do queijo. Pertencentes ao grupo coliformes, a *E. coli*, é um bacilo Gram negativo, fermentador de lactose com produção de gás, anaeróbio facultativo e possui como *habitat* natural o trato intestinal de humanos e animais homeotérmicos, tornando-se assim um potencial indicador de contaminação de origem fecal (ALVES *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010b).

Segundo Hleba *et al.* (2011), as bactérias que compreendem o grupo coliformes não são capazes de sobreviver às condições empregadas durante a pasteurização, sendo assim, a sobrevivência de tais microrganismos após este tratamento térmico, indica falhas no processamento. Além disso, algumas cepas de *E. coli* possuem fatores de virulência como a produção da toxina Shiga (STEC), agravante na patogênese e resistente à pasteurização, com 2.801.000 casos do mundo notificados, desencadeando distúrbios entéricos graves (AMAGLIANI *et al.*, 2018), colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica (CASTRO *et al.*, 2017).

De acordo com Toro *et al.* (2018), as variantes da STEC que apresentam maior virulência são as Stx1 e Stx2, sendo que a primeira é considerada menos perigosa que a Stx2. A contaminação de STEC em cadeias leiteiras pode ocorrer pelo contato direto das fezes bovinas com o leite no momento da ordenha ou em qualquer etapa do processamento (CARDOSO e MARIN, 2016).

Rosário *et al.* (2021), avaliando a qualidade microbiológica de produtos lácteos de quinze laticínios da Bahia, constataram que 30% das amostras analisadas apresentaram contagens elevadas para o grupo de coliformes termotolerantes incluindo amostras de queijo coalho, sendo que das análises, foram recuperados nove isolados STEC pertencentes a variante Stx2 em creme pasteurizado, queijo minas padrão, queijo minas frescal e ricota. Outros estudos evidenciam que dentre os patógenos mais comumente encontrados em queijos coalho são *Listeria monocytogenes* (CHOI *et al.*, 2016), *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* ssp (MENDONÇA *et al.*, 2019).

A *Salmonella* apresenta aproximadamente 2.600 sorovares identificados e é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos, representando ameaça à saúde pública (AMAJOUD *et al.*, 2017; RICKE *et al.*, 2018), sendo que sua contaminação pode ocorrer em diversas etapas do processo de fabricação (RICKE *et al.*, 2018).

Cerca de milhões de casos de salmonelose ocorrem a cada ano nos Estados Unidos, dos quais 95% são casos de origem alimentar (HLEBA *et al.*, 2011). Vale ressaltar que todas as cepas de *Salmonella* são patógenos responsáveis por desencadear gastroenterite e vários sorotipos vem sendo reportados em queijos (CHOI *et al.*, 2016). Além dos queijos, a presença da *Salmonella* ssp foi relatada em produtos cárneos, frutos do mar, legumes, vegetais, ovos, alimentos frescos e leites (PUI *et al.*, 2011; HUR *et al.*, 2012; ABAKPA *et al.*, 2015; GRASSO *et al.*, 2015), conforme demonstrado na Figura 6.

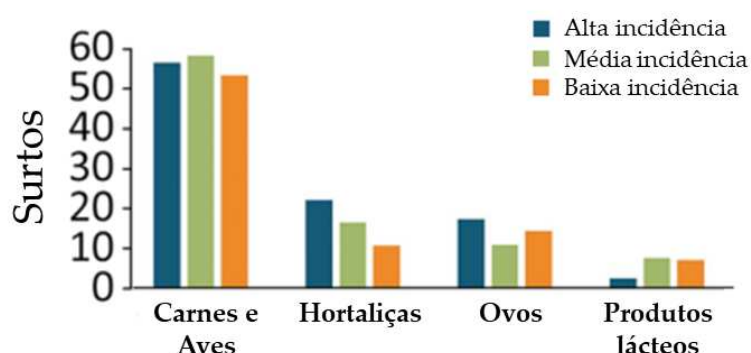


Figura 6. Alimentos mais comuns implicados em doenças transmitidas por alimentos por *Salmonella* ssp por categoria de alimentos nos Estados Unidos, 2009-2018 (Adaptado de White *et al.* 2022).

O gênero *Salmonella* é considerado termossensível, e tem sua temperatura ótima de crescimento entre 37° a 38°C, podendo obter crescimento em condições mais amenas se o período de incubação for estendido, e pode-se manter viável em produtos lácteos, como o queijo, por 5 a 8 meses (MODI *et al.*, 2001). Um dos primeiros grandes surtos envolvendo derivados lácteos, foi relatado em 1982, no Canadá, onde houve uma grande contaminação de queijos tipo Cheddar, o qual continha aproximadamente 200 UFC/g do microrganismo, onde as altas contagens de *Salmonella* ssp foi atribuída a utilização de leite cru durante o processo de fabricação (WOOD *et al.*, 1984). Souza *et al.* (2020), analisando queijo coalho oriundas da Paraíba, relatou que dentre as sete amostras, cinco continham a presença de *Salmonella* spp, o que não é permitido pela legislação brasileira vigente.

A listeriose é uma infecção grave causada pela ingestão de alimentos contendo células viáveis da bactéria *Listeria monocytogenes*, responsável por adoecer aproximadamente 1.600 pessoas a cada ano, com uma estimativa de 260 mortes

(PALACIOS *et al.*, 2022). No período de 2008 a 2016 na Europa, aumentaram-se os casos de listeriose humana com 2.536 casos registrados, dos quais 97,7% foram hospitalizados e 16,2% foram casos de óbitos (HEIR *et al.*, 2018).

Capaz de sobreviver e multiplicar em vários ambientes, a *L. monocytogenes* é uma grande preocupação para ambientes de processamento de alimentos, assim como as indústrias de laticínios (KAHRAMAN *et al.*, 2010; HEIR *et al.*, 2018; FANCELLO *et al.*, 2020). Em morfologia de bacilo Gram positivo, a *L. monocytogenes* é considerado um patógeno intracelular facultativo que se adapta em uma grande faixa de temperatura, pH, concentração de sal e em baixa atividade de água, podendo ser isolada em diversos alimentos como produtos a base de carne, vegetais, leite e produtos lácteos (LEE *et al.*, 2017; MADDEN *et al.*, 2018; MATA *et al.*, 2022). Dentre os ramos das indústrias alimentícias, os laticínios foram associados a aproximadamente metade de todos os surtos de listeriose relatados na Europa e nos Estados Unidos (FANCELLO *et al.*, 2020).

Atualmente, treze sorotipos de *L. monocytogenes* são distribuídos mundialmente em quatro linhagens, entretanto, a 1/2a, 1/2b e 4b são mais associadas a quadros de listeriose humana, sendo que a 4b representa cerca de 50% dos surtos epidêmicos em todo o mundo (MATA *et al.*, 2022). Dentre as manifestações da listeriose em humanos, as que apresentam maior taxa de letalidade são infecções perinatais/ neonatais (80%), meningite listerial (70%) e septicemia (50%), e como grupo de risco, destacam-se mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e imunocomprometido (AZENHA, SILVA, 2022).

A contaminação de *L. monocytogenes* em alguns tipos de queijos é facilitada por características inerente ao produto, tais como pH levemente ácido (5,0 – 6,3), alta atividade de água (> 0,97) e baixo teor de sal (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2018). Estudos já evidenciaram que laticínios brasileiros são frequentemente contaminados por *L. monocytogenes*, conforme apresentado por Oxaran *et al.* (2017), Catão e Ceballos (2001) e Barancelli *et al.* (2014).

2.3 *Staphylococcus aureus*

Considerado um importante patógeno de origem alimentar causador de intoxicação alimentar, o *Staphylococcus aureus* foi detectado em uma grande variedade de alimentos (CHEN *et al.*, 2020). O *S. aureus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui como característica morfo-tintorial ser do agrupamento

de cocos Gram-positivos (TORTORA *et al.*, 2002). A bactéria possui aproximadamente 1,0 µm de diâmetro, não contem flagelo, não é esporulada, é anaeróbia facultativa e apresenta maior crescimento sob condições aeróbias e mesófilas, com faixa total de temperatura de crescimento de 15°C a 47,8°C (FRANCO *et al.*, 2008; KONEMAN *et al.*, 2008).

As espécies estafilocócicas podem atuar como colonizadores comensais da pele habitando as mucosas do trato respiratório superior, trato urogenital inferior e também são encontradas em mucosas de animais (KLUYTMANS, 2010; ZEHRA *et al.*, 2020). Aproximadamente, 20 a 30% da população são portadores assintomáticos persistentes, e 30% possui o *S. aureus* como colonizador transitório, ou seja, são portadores intermitentes (PLATA *et al.*, 2009).

A alta contagem deste microrganismo em alimentos pode refletir as condições de manuseio, produção e processamento, além de ser responsável por quadros recorrentes de intoxicação alimentar, uma vez que é produtor de toxinas alimentares termorresistentes (PLATA *et al.*, 2009).

Além de colonizar a pele de humanos, o *S. aureus* também é capaz de habitar as mucosas de animais, assim como os rebanhos leiteiros, cujo o processo infeccioso se instala nas glândulas mamárias e é responsável por desenvolver a mastite estafilocócica (BEZERRA *et al.*, 2020). A mastite pode ser classificada em clínica, quando é notório os sinais de inflamação nos úberes dos animais, bem como a redução do volume do leite ordenhado, e em subclínica, que possui caráter silencioso e não se tem alterações perceptíveis no úbere ou no leite, e neste último caso, é comum que o produtor não tenha conhecimento da existência da patologia, deixando o rebanho acometido desacompanhado (KUMARI *et al.*, 2020), refletindo na queda da qualidade microbiológica dos sub-produtos e consequentemente, a inocuidade da saúde do consumidor (ARAGÃO *et al.*, 2022).

Outro ponto de extrema relevância é que o *S. aureus* é capaz de causar infecção intermitente, ou seja, desencadear o processo de mastite crônica subclínica, no qual ocorre a substituição do tecido sadio, pelo tecido fibroso, dificultando a síntese do leite (GONÇALVES *et al.*, 2020). A capacidade de invasão do microrganismo é justificada pela produção de fatores de virulência, permitindo que a bactéria colonize as glândulas mamárias e adentre os tecidos. Tais fatores englobam componentes estruturais como coagulase, ácido teicóico, proteases, entre outros (ABRIL *et al.*,

2020), e produção de toxinas (COSTA *et al.*, 2018, AGUILAR, 2012), conforme apresentado na Tabela 4.

O leite e seus derivados lácteos, assim como o queijo, apresentam ótimos substratos para o crescimento e multiplicação de *S. aureus*, sendo que existem alguns pontos importantes pelos quais o patógeno pode contaminar tais alimentos, como os próprios manipuladores, meio ambiente ou diretamente pelo animal colonizado (ABRIL *et al.*, 2020). Contaminações cruzadas como transmissão do patógeno ao leite pelo homem durante e após a ordenha e falhas no processamento e estocagem, também contribui para a propagação do microrganismo (CHEN *et al.*, 2020), evidenciando a necessidade de avaliação contínua da qualidade microbiológica dos queijos.

Tabela 4. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

Fator de Virulência	Atividade/ Função
Ácido teicóico	Polissacarídeo capaz de ativar a via complemento e estimular a secreção de citocinas
Adesinas	Auxilia na aderência da bactéria nas células do hospedeiro
Cápsula	Estrutura polissacarídica que envolve a bactéria e protege contra a fagocitose
Coagulase	Converte o fibrinogênio em fibrina, dificultando a fagocitose
Catalase	Converte o peróxido de hidrogênio que apresentaria função tóxica a bactéria
Hialuronidase	Despolimeriza o ácido hialurônico, proporcionando a a propagação do microrganismo
<i>sea</i> * - Enterotoxina A	Intoxicação alimentar
<i>seb</i> * - Enterotoxina B	Intoxicação alimentar
<i>sec</i> * - Enterotoxina C	Intoxicação alimentar
<i>sed</i> * - Enterotoxina D	Intoxicação alimentar
<i>eta</i> * - Exfoliatina A	Promove clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso)
<i>tst</i> * - Toxina do choque tóxico- 1	Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas, incluindo erupção cutânea e descamativa
<i>hla</i> ** - α -hemolisina	Lisa as hemácias e ocasiona danos às plaquetas
<i>hlb</i> ** - β -hemolisina	Lisa as hemácias e ocasiona danos às plaquetas
<i>hld</i> ** - δ -hemolisina	Propriedade tensoativa frente aos macrófagos e leucócitos
<i>hlg</i> ** - γ -hemolisina	Hemolisina/citotoxina

* = Superantígenos

** = Citotoxinas

Fonte: Adaptado de Iwatsuki *et al.* (2006), Gindri (2013), Santos *et al.* (2007).

2.4 Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)

A ocorrência de toxinas bacterianas é apontada como a terceira causa mais evidentes de casos de intoxicação alimentar em todo o mundo (GRISPOLDI *et al.*, 2021), sendo que a intoxicação alimentar por estafilococos é desencadeada pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pré-formadas em alimentos (ZHANG *et al.*, 2022). As SEs são proteínas altamente estáveis, termorresistentes (com capacidade de manterem-se íntegras por até 100°C durante 2 horas), e resistentes a enzimas proteolíticas, ou seja, sua função se mantém preservada no trato digestório (ARGUDIN *et al.*, 2010).

Os sintomas mais comuns dessa intoxicação são vômitos, diarreia, náuseas e cólicas abdominais, e os primeiros sinais aparecem dentro de duas a seis horas após a ingestão da toxina. Apenas alguns microgramas (μg) de SEs são suficientes para desencadear a intoxicação em um adulto e aproximadamente 100 nanogramas (ng) para afetar crianças (WU *et al.*, 2016), sendo que a gravidade dependerá do sistema imunológico do paciente e da quantidade de toxina ingerida (FISHER *et al.*, 2018). A resposta inflamatória gerada pelas SEs resulta em danos graves no jejuno e íleo, além de alterar a expressão de citonas, produção de linfócitos T, macrófagos, monócitos e mastócitos (ABRIL *et al.*, 2020).

Atualmente, na literatura são listadas vinte e quatro enterotoxinas estafilocócicas (SEs), entretanto, apenas cinco são consideradas enterotoxinas clássicas devido aos métodos de identificação disponível do mercado, sendo a *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* (GRISPOLDI *et al.*, 2021). Tais toxinas são constituídas de 220-240 aminoácidos e apresentam pesos moleculares semelhantes (ABRIL *et al.*, 2020). As enterotoxinas são subdivididas em quatro grandes grupos com base em suas sequências de aminoácidos e nucleotídeos, sendo eles, o grupo SEA (*sea*, *sed*, *see*, *se1j*, *seh*, *sem*, *seo*, *sep*, *ses*), grupo SEB (*seb*, *secs*, *seg*, *ser*, *se1u*, *se1w*) grupo SEI (*sei*, *sek*, *sel*, *seq*, *sem*, *se1v*) e o grupo SE1X (TSST-1, *set*, *se1x*, *se1y*) (ONO *et al.*, 2015).

A alta disponibilidade de amido e proteína presente em alimentos como carne, ovos e queijos favorece a presença das SEs, mas sua produção também é influenciada por outros fatores ideais e faixas necessárias para o crescimento, como A_w (0,86 a 0,99), pH (4,9 a 9,6) e temperatura (10°C a 46°C) (ABRIL *et al.*, 2020; CAMPOS *et al.*, 2022). Segundo estudos de Nia *et al.* (2016), as categorias de alimentos mais comumente envolvidos em doenças estafilocócicas são alimentos

mistos (29,7%), carnes e produto cárneos (20,8%), queijos e outros produtos lácteos (14,4%), produtos de panificação (8,4%) e peixes (6,5%).

De acordo com Wu *et al.* (2016) e Babic *et al.* (2018), as enterotoxinas clássicas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* são responsáveis por 95% dos casos de intoxicação estafilocócica, e as *sea* e *sed* são as mais relatadas em surtos alimentares, devido a maior estabilidade em faixas mais amplas de Aw e condições de pH. Outro estudo, tal como Francoz *et al.* (2017), reafirma que os casos de intoxicações estafilocócicas relacionadas ao consumo de produtos lácteos, são oriundos de animais com o quadro de mastite estafilocócica. Outro meio de contaminação dos alimentos envolvendo as SEs geralmente ocorre devido a falta de higiene na produção, diretamente ligada aos manipuladores, no armazenamento, temperatura de transporte ou na comercialização (AYDIN *et al.*, 2011; KOTZEKIDOU, 2013).

2.5 *Staphylococcus aureus* e a resistência aos antibióticos

Os antibióticos são substâncias sintéticas ou naturais que devem apresentar atividade antimicrobiana efetiva e seletiva, serem preferencialmente mais bactericidas do que bacterostáticos a fim de danificar definitivamente a parede celular e promover a morte dos microrganismos (ARAUJO, 2013).

A prática de antibioticoterapia vem sendo aplicada visando o aumento da qualidade de vida do animal e a qualidade microbiológica de seus subprodutos (CHUNG *et al.*, 2021). Estudos comprovam a relação entre o uso abusivo de antibióticos na agricultura e no tratamento dos animais com o aumento da incidência de bactérias resistentes na comunidade (ROLA *et al.*, 2015; HARAN *et al.*, 2012).

Atualmente, quase todos os países enfrentam resistência microbiana, considerada um problema de saúde pública global por limitar drasticamente as opções de tratamento em humanos e animais (BELHOUT *et al.*, 2022), como é o caso das cepas denominadas MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, ou seja resistentes a metilicina (CHUNG *et al.*, 2021), conhecidas por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (MURUGESAN *et al.*, 2015; ROLO *et al.*, 2012).

Antigamente, as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* eram tratadas apenas com penicilina, a qual exercia seu mecanismo de ação sobre a parede celular bacteriana. Entretanto, a resistência antimicrobiana do microrganismo foi relatada pela primeira vez em meados da década de 1940, sendo que a resistência ao anel β -lactâmico da droga foi inativado a partir da produção de β -lactamases (FOSTER,

2017), que são enzimas microbianas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico (Figura 7) dos fármacos através da ligação C-N (BERTONCHELI, HORNER, 2008).

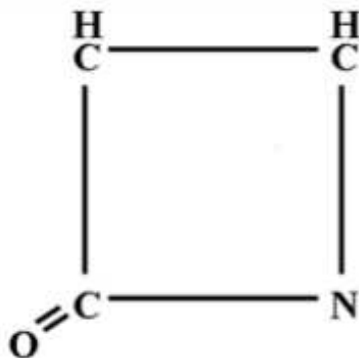


Figura 7. Estrutura química do anel β -lactâmico (ARAUJO *et al.*, 2020).

Na tentativa de reverter a resistência a penicilina, na década de 1950 utilizou-se a metecilina (primeira penicilina semi-sintética) resistente à enzima β -lactamases. Os primeiros antibióticos resistentes à β -lactamase disponíveis para o uso clínico foram oxacilina e metecilina. Porém, em 1961, identificou-se o primeiro caso de MRSA (MONECKE *et al.*, 2013). Apesar da ampla resistência fornecida, e mesmo que a metecilina não seja mais usada clinicamente, a nomenclatura MRSA permaneceu para tais isolados (VESTERGAARD *et al.*, 2019).

O *Staphylococcus aureus* apresenta três mecanismos distintos de resistência à metecilina: a hiperprodução de β -lactamases; a presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP protein binding penicilina) e as modificações na capacidade de ligação das PBPs (SOUZA *et al.*, 2005; MENEGOTTO, PICOLI, 2007).

Pelo fato dos antibióticos apresentarem diferentes mecanismos de ação, as bactérias, por sua vez, desenvolveram diferentes mecanismos de resistência. Normalmente a resistência bacteriana aos antibióticos é devido a: uma mudança na permeabilidade da membrana celular que, ou impede a entrada do antibiótico na célula, ou faz com que o antibiótico seja bombeado para o meio extracelular; aquisição da capacidade de degradar ou inativar o antibiótico; ou surgimento de uma mutação que altera o alvo do antimicrobiano (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Um dos genes que codificam a resistência ao antibiótico é o *blaZ*, responsável pela produção da β -lactamase (FOSTER, 2017; PLATA *et al.*, 2009; CHUNG *et al.*,

2021). O anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um de nitrogênio, não determina somente o mecanismo de ação dos antibióticos, mas também é responsável por inibir a síntese de peptidoglicano da parede celular do microrganismo, levando-o a morte (ARAUJO, 2013).

Os antibióticos pertencentes a família dos β -lactâmicos são considerados os mais heterogêneos, pois não apresentam estrutura química igual, contudo, todos apresentam o anel β -lactâmico. É a classe de antibióticos amplamente utilizada devido a sua baixa toxicidade, eficácia terapêutica e propriedades farmacocinéticas e são divididos em diferentes grupos como: penicilina, cefalosporinas, carbapenemes e monobactamo (BARBOSA, 2013) (Figura 8).

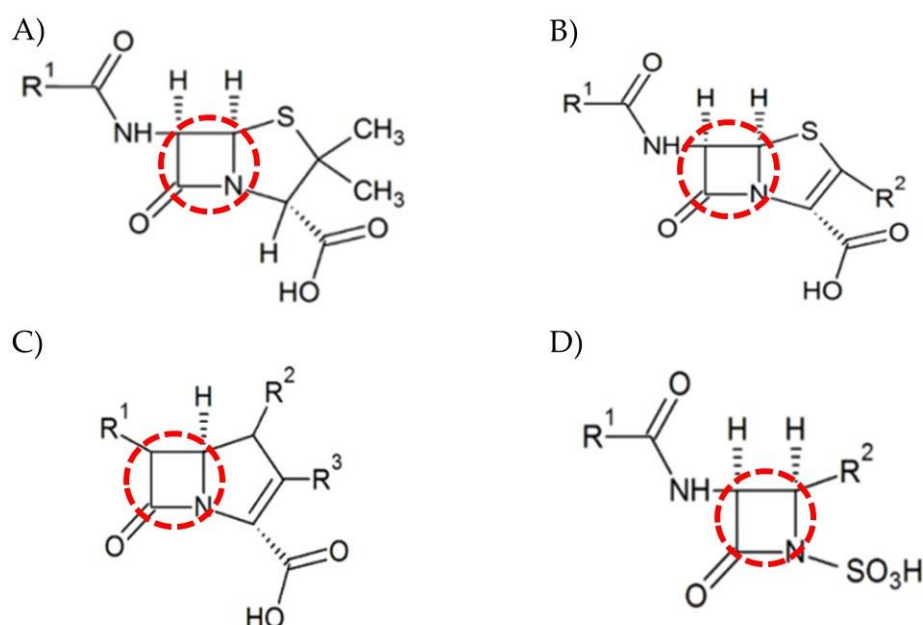


Figura 8. Estrutura molecular dos antibióticos β -lactâmicos. (A) Penicilina, (B) Cefalosporina, (C) Carbapenêmico (D), Monobactâmico (ARAUJO *et al.*, 2020).

Outro mecanismo de resistência da MRSA está relacionado com uma alteração da proteína ligadora de penicilina (PBPs), denominada PBP2a. A PBP2a possui baixa afinidade com os antibióticos β -lactâmicos fazendo com que o sítio ativo da bactéria não se ligue à meticilina ou a outros antibióticos da classe, conferindo resistência (VIVEHANANTHAN, LUPHZHY, 2021). Tal processo é mediado pelo gene *mecA* que está localizado em um elemento genético móvel de 20-60 kb conhecido

como cassete estafilocócico cromossomal-*mec* (SCC*mec* – *staphylococcal chromossome cassette mec*) (FOSTER, 2017; CHUNG *et al.*, 2021).

Os SCC*mec* são classificados de I a V de acordo com a complexidade e natureza de seus genes (SUZUKI *et al.*, 1992; MOUSSALLEM *et al.*, 2007), e a prevalência do tipo I, II e III são de origem hospitalar (denominado HA-MRSA), e as do tipo IV e V são comumente associadas em infecções na comunidade (CA-MRSA). O surgimento de CA-MRSA se deu durante a década de 1990 e suas cepas costumam ser mais virulentas, ocasionando infecções como pneumonia e sepse em indivíduos saudáveis e sem comorbidades (SNITSER *et al.*, 2020). Outra nomenclatura que vem crescendo significativamente é o LA-MRSA, associado aos achados de MRSA em animais de produção leiteira na Europa. De acordo com Wendlandt *et al.* (2013), as cepas LA-MRSA podem ser transferidas entre os animais e hospedeiros humanos, mesmo em um curto período de contato, podendo evoluir para uma colonização ou infecção oriundo do manuseio e/ou consumo de alimentos contaminados por MRSA.

A pesquisa e identificação de MRSA em alimentos de origem animal tais como: carne, leite de vaca e produtos lácteos, foi amplamente avaliado na última década (LARSEN *et al.*, 2016), sendo que o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina vem sendo a principal causa de quadros de mastites em rebanhos leiteiros (KHAIRULLAH *et al.*, 2020). Estudo realizado por Coelho e colaboradores (2009), avaliou que no Brasil, a taxa de prevalência de MRSA foi de 25% quando avaliado 98 amostras de leite de vacas diagnosticada com mastite subclínica.

Além dos leites crus, cepas de MRSA foram identificadas de uma grande variedade de produtos lácteos, como queijo, iogurte, manteiga, sorvete e leite pasteurizado (NORMANNO *et al.*, 2007; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018; TITOUCHE *et al.*, 2019). Além das resistências aos antibióticos, o *S. aureus* também possui genes responsáveis pela formação de biofilmes (HAABER *et al.*, 2017).

2.6 Produção de biofilmes

O biofilme é resultado da aderência de células microbianas ligadas a uma superfície e mantidos por uma matriz polimérica altamente hidratada contendo exopolissacarídeo (polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias). A matriz polimérica atua como “cola natural”, aderindo as células bacterianas e fornecendo proteção à desidratação, colonização por bacteriófagos e

resistência a antimicrobianos (GILBERT *et al.*, 2003; ARCHER *et al.*, 2011; DEFRANCESCO *et al.*, 2017).

A formação inicial do biofilme acontecer a partir de uma única célula, entretanto, gradientes de oxigênio, nutrientes e receptores de elétrons são capazes de alterar a expressão gênica do microrganismo, potencializando o desenvolvimento do biofilme (RANI *et al.*, 2007; ARCHER *et al.*, 2011).

A matriz do biofilme é basicamente constituída por água, com aproximadamente 95 -97%, conforme apresentado na Tabela 5 (SEKHARAN, 2017).

Tabela 5. Componentes do biofilme

Componentes	% da Matriz
Água	95 – 97%
Células microbianas	2 – 5%
Polissacarídeos	1 – 2%
Proteínas	1 – 2%

Fonte: Adaptado de Sekharan (2017).

As etapas que compreendem a formação do biofilme são: adesão inicial, formação de microcolônias, formação do biofilme, maturação e desprendimento (CHAGNOT *et al.*, 2013), conforme demonstrado na Figura 9.

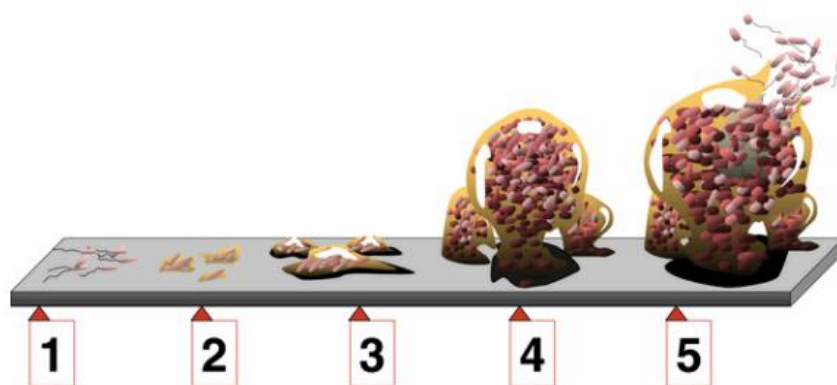


Figura 9. Ciclo de desenvolvimento do biofilme (KONING, 2010). Etapa 1, processo de aderência do microrganismo; Etapa 2, formação de microcolônias; Etapa 3, formação do biofilme; Etapa 4, maturação do biofilme; Etapa 5, desprendimento do biofilme.

Segundo Stoodley *et al.* (2002), Banerjee *et al.* (2015) e Sekharan (2017), a etapa 1 compreende a aderência do microrganismo de vida livre a superfície

transitória, sendo conhecida como fase reversível. A etapa 2 é irreversível e promove um ambiente ideal para fixação de microrganismos e formação de microcolônias. Aderidas à superfície, as bactérias multiplicam-se através de sinais químicos dando origem a etapa 3, formando assim, o biofilme. A maturação do biofilme (etapa 4) envolve substâncias como açúcares, poros e canais de água que fornecem a troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos para o crescimento celular atingindo o potencial máximo de reprodução (KONING, 2010). Por fim, quando a matriz de polímero não é mais favorável para o crescimento e manutenção do biofilme, ocorre o desprendimento (etapa 5) das porções aderidas, dando origem as células microbianas de vida livre que poderão recomençar o processo, com formação de novos biofilmes (STOODLEY *et al.*, 2002; SEKHARAN, 2017). A participação de proteínas na membrana da parede celular e de algumas estruturas desempenham papel fundamental para a formação de biofilmes de *S. aureus* (FOSTER *et al.*, 2014), tais como *Bap*, *PIA*, *SacC* e *SasG* (BATISTÃO, 2014).

A presença da *Bap* (proteína associada ao biofilme) na superfície das bactérias Gram positivas é responsável por fixar e mediar a adesão intercelular (CUCARELLA *et al.*, 2001; TORMO *et al.*, 2005; LASA; PENADES, 2006). Constituída com aproximadamente 2276 aminoácidos, a *Bap* pode ser dividida principalmente em região A (de 45 – 360 aminoácidos) e região B (361 – 819 aminoácidos). Além de contribuir para formação de biofilmes, a proteína também está envolvida em receptores de células hospedeiras que facilitam a colonização e desenvolvimento de infecções crônicas (CALLEBAUT *et al.*, 2000; LASA; PENÁDES, 2006).

Outra proteína que desempenha papel fundamental para o desenvolvimento do biofilme é a adesina intercelular polissacarídica (PIA) que é regulada pela *Bap* (CUCARELLA *et al.*, 2014), e sintetizadas por enzimas codificadas pelo gene *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* (O'GARA, 2007; CERCA *et al.*, 2008; ROHDE *et al.*, 2010).

A PIA, também conhecida como PNAG (poli-N-acetilglucosamina) de acordo com a composição química, é um polímero parcialmente desacetilado de N-acetilglucosamina ligada a beta1-6 que juntamente com ácidos teicóicos e proteínas constitui a maior parte da matriz extracelular dos estafilococos formadores de biofilme (OTTO, 2008), aderindo às células da matriz proteica por interação eletrostática (MACK *et al.*, 1996; ARCIOLA *et al.*, 2015).

A presença de *SasC* (proteína C de superfície de *S. aureus*) está intimamente envolvida na adesão intercelular e na formação de biofilmes. Sua sequência consiste

em 6558 nucleotídeos e é responsável por codificar proteínas de 2186 aminoácidos, além de ser responsável pela formação de aglomerados de células de *S. aureus* (SCHROEDER *et al.*, 2009; BABA *et al.*, 2002; VÁSQUEZ-SANCHEZ, RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018).

A SasG (proteína G de superfície de *S. aureus*), compreende uma sequência de N-terminal e está envolvida na fase de formação do biofilme, processo que requer concentrações fisiológicas de Zn^{2+} , sendo de extrema relevância para a maturação da matriz polimérica (CONLON *et al.*, 2002; GEOGHEGAN *et al.*, 2010).

Estas proteínas responsáveis pela formação de biofilmes são reguladas por um complexo sistema de genes, mais conhecido como *quorum sensing* (QS) *Agr* (*accessory gene regulator*) (KALIA *et al.*, 2018). É definida como QS a comunicação entre as bactérias através de pequenas moléculas sinalizadoras que coordenam o comportamento dos microrganismos em relação ao meio ambiente (SCHAUDER, BASSLER, 2001).

Na indústria de laticínios, a formação de biofilmes é um grande empecilho à segurança dos alimentos pela possibilidade de desprendimento de porções aderidas e contaminação da linha de produção. Desta forma, biofilmes podem representar riscos à saúde do consumidor e diminuição do tempo de vida de prateleira de produtos (GILBERT *et al.*, 2003). O uso de sanitizantes pode ser ineficiente para bactérias formadoras de biofilmes (LANGSRUD *et al.*, 2003; FRIEDRICZEWSK *et al.*, 2018).

2.7 Integração entre a saúde humana, saúde animal e ambiente

No final do século 19 e o início do século 20, profissionais da área de medicina infatizaram que o conceito de saúde humana e saúde animal estão intimamente ligadas com o meio ambiente (CARNEIRO, PETTAN-BREWER, 2021). Entretanto, a preocupação entre estas três esferas ganhou real espaço na última década devido as complexas mudanças globais, onde se destaca o aumento da população humana e sua urbanização, a intensa produção pecuária e a invasão de ecossistema e danos ao ambiente (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

O termo *One Health* pode ser definido como conceito global de promoção a saúde humana com base em uma estratégia para melhor compreensão dos problemas de saúde atuais criados pelas interações entre animais, pessoas, plantas e meio ambiente (CARNEIRO, PETTAN-BREWER, 2021). Segundo Embrapa (2023), *One Health* se trata de uma abordagem multidisciplinar, colaborativa e multissetorial,

abrangendo níveis local, regional, nacional e global, reconhecendo a interconexão compartilhada entre todos os seres vivos e o ambiente.

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) promove a abordagem em *One Health* com enfoque em agricultura sustentável, segurança dos alimentos, nutrição, saúde animal e vegetal e resistência antimicrobiana, sendo que o principal objetivo é prevenir, detectar e controlar doenças entre humanos e animais, garantindo a qualidade dos alimentos (FAO, 2023). Estudos estimam que até 75% das doenças infecciosas humanas relatadas nas últimas décadas são zoonóticas, isto é, se originaram de animais, reforçando a importância do conceito *One Health*. A grande maioria dos antimicrobianos é aplicado tanto em infecções humanas, quanto animais, incluindo mamíferos, aves, peixes, abelhas produtoras de mel, entre outros, e a sua administração é feita como profilaxia, tratamento de infecções e em situações pós-cirúrgicas (McEWEN, COLLIGNON, 2018).

Contudo, ainda há a administração de antibióticos de baixa dosagem por um longo período de exposição visando a promoção do crescimento animal, sendo que tal condição auxilia na disseminação de bactérias resistentes entre os grupos de animais, humanos, alimentos e outras vias ambientais (Figura 10) (McEWEN, COLLIGNON, 2018).

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é considerado um patógeno zoonótico (Figura 11) emergente, com importância veterinária e de saúde pública (ALGAMMAL *et al.*, 2020). Segundo Elsayed *et al.* (2015), o *S. aureus* é considerado mundialmente um patógeno causador de infecções intramamárias em vacas leiteiras, acarretando perdas econômicas para as fazendas produtoras de leite. Paralelamente o consumo de produtos lácteos contaminados com cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina pode ser responsável por favorecer à resistência ao referido princípio ativo para microrganismos pertencentes à microbiota do corpo humano (KHAIRULLAH *et al.*, 2020).

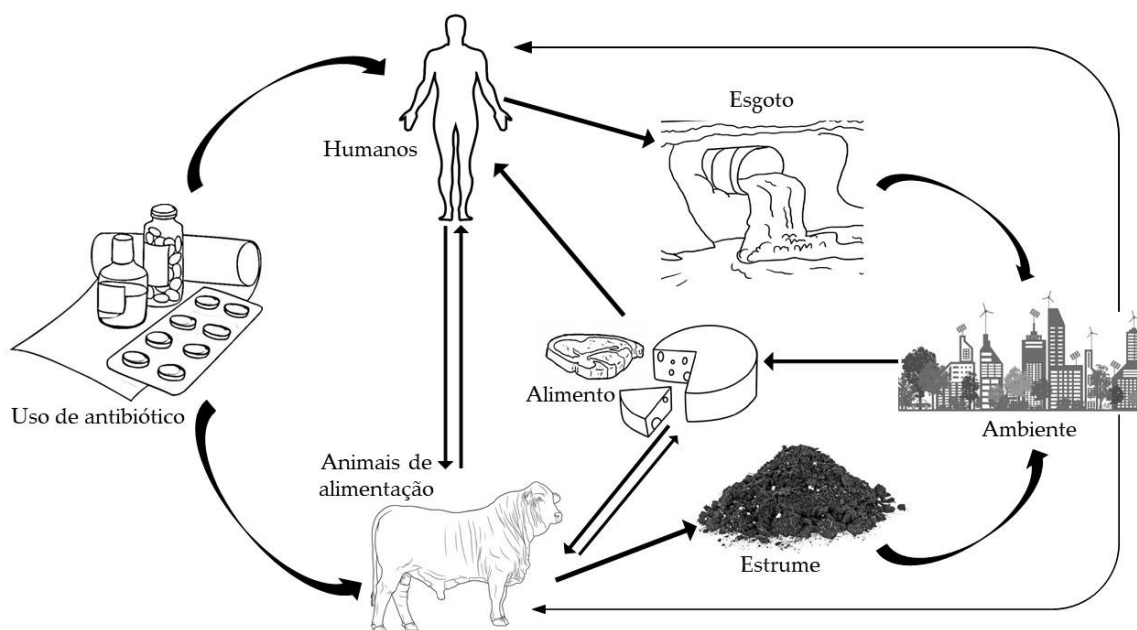


Figura 10. Mecanismos de resistência antimicrobiana. A resistência antimicrobiana pode se espalhar por múltiplas vias diretas e caminhos indiretos para humanos e animais de produção (setas) (adaptado de Woolhouse e Ward, 2013).

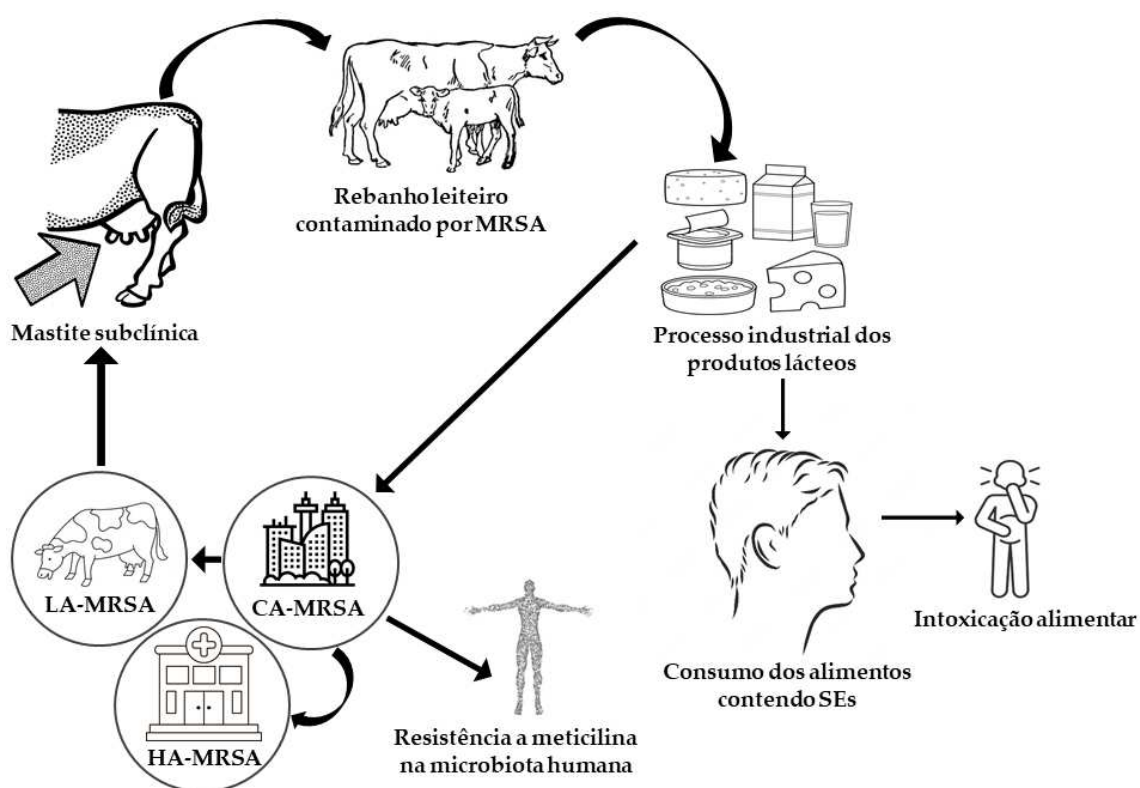


Figura 11. Mecanismos de difusão de MRSA em ambiente comunitário, hospitalar e em animais de alimentação (Autoria Própria).

Os MRSAs desenvolveram novos mecanismos eficazes de resistência frente aos antibióticos, e atualmente são considerados multidroga resistentes (MDR), desta forma, é considerado um fator de risco global (ALGAMMAL *et al.*, 2020). Frente ao exposto, é de extrema importância a avaliação microbiológica de queijos, afim de avaliar a presença de microrganismos patogênicos e potenciais causadores de intoxicação alimentar, bem como, avaliar genes de resistência para prevenção do surgimento de novas cepas multirresistentes, afim de garantir a inocuidade dos consumidores, dos animais de produção e do meio ambiente.

2.8 Referência bibliográfica

ABAKPA, G.O. *et al.* Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolated from fresh produce and environmental samples. **Environmental Nanotechnology Monitoring and Management**. 3: 38-46, 2015.

ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Evolução da produção mundial de leite**, 2017. Disponível em http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=1796&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6. Acesso em: fevereiro de 2021.

ABRIL, A.G. *et al.* *Staphylococcus aureus* Exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. **Toxins**. 12(9): 537, 2020.

AGUILAR, A. P. **Expressão de genes de *Staphylococcus aureus* em resposta a concentrações subinibitórias de antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2012.

ALGAMMAL, A.M. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**. 13: 3255-3565, 2020.

ALVES, A.L. *Escherichia coli* como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos no Brasil: Dados epidemiológicos, principais alimentos, fatores causais, classificação, sintomatologia e medidas profiláticas. **Anais III CONBRACIS**, Campina Grande: Realize Editora, 2018.

ALVES, B.F.C. *et al.* Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina: Revisão. **Pubvet**. 14(4): 1-6, 2020.

ALVES, L.M.C. *et al.* Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís-MA. **Pesquisa em Foco**. 17(2):1-13, 2009.

ALVES, T. *et al.* Mastite Bovina: Tratamento Convencional e Ação de Compostos Extraídos de Plantas. **Uniciências**. 25(1): 20-25, 2021.

AMAGLIANI, G. *et al.* Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in ground beef and bean sprouts: Evaluation of culture enrichment conditions. **Food Research International**. 103: 398–405, 2018.

AMAJOUD, N. Prevalence, serotype distribution, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food products in Morocco. **The Journal of Infection in developing countries**. 11(2):136-142, 2017.

AMARAL, S.M.B. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **Revista Científica Multidisciplinar**. 2(11), 2021.

AMARANTE, J.O.A. **Queijos do Brasil e do Mundo: Para iniciantes e Apreciadores**. Mescla: São Paulo, Brasil, 2015.

ARAGÃO, B. B. *et al.* Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Microbiology and Infectious Diseases**. 84, 2022a.

ARAUJO, L. P. P. *et al.* **Perfil das unidades produtoras e diagnóstico do impacto ambiental na fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG**. In: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica. 8, 2011.

ARAUJO, A.B.N. **As doenças infecciosas e a História dos Antibióticos**. Dissertação, Universidade Fernando Pessoa, Porto. 79p, 2013.

ARAUJO, L.L.C. *et al.* Study of the beta-lactamase enzyme and its relationship with antibiotic resistance. **Research, Society and Development**. 9(7), 2020.

ARCHER, N. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence**. 2(5): 445-459, 2011.

ARCIOLA, C. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 5(7): 1-10, 2015.

ARGUDÍN M.A. *et al.* Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**. 2(7):1751-1773, 2010.

AYDIN, A. *et al.* Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**. 8(1):63–69, 2011.

AZENHA, N.R.M., SILVA, M.V.M. Contamination by *L. monocytogenes* in cheese. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. 4(2): 2556-2565, 2021.

BABA, T. *et al.* Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet**. 359: 1819–1827, 2002.

BANERJEE, P. *et al.* Biofilm Formation: a comprehensive review. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**. 3(2): 556-560, 2015.

BANSAL, V., VEENA, N. Understanding the role of pH in cheese manufacturing: general aspects of cheese quality and safety. **Journal of Food Science and Technology**. 11(29), 2022.

BARANCELLI, G. V. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 173, 21–29, 2014.

BARBOSA, S.V. **Bactérias de Gram negativo produtoras de e β -lactamases e mecanismos moleculares implicados na expressão da resistência à tigeciclina**. Dissertação. Universidade de Lisboa. 95p, 2013.

BATISTÃO, D. W. F. **Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina e sua associação com o perfil clonal**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia. 2014.

BELHOUT, C. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Methicillin-Resistant *Staphylococci* and *Mammaliicoccus* (MRNaS) Associated with Animals and Food Products in Arab Countries: A Review. **Veterinary Sciences**. 9(7):317, 2022.

BELOTI, V. *et al.* Impacto da implantação de boas práticas de higiene na ordenha sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 67(388): 5-10, 2012.

BERTONCHELI, C. M.; HORNER, R. Uma Revisão sobre β - lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 44(4), 2008.

BEZERRA, J. S. *et al.* Effect of high somatic cell counts on the sensory acceptance and consumption intent of pasteurized milk and coalho cheese. **Food Science Technology**. 1-9, 2020.

BLAIR, J.M.A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. 13: 42-51, 2015.

BOUDALIA, S. Characterization of traditional Algerian cheese “Bouhezza” prepared with raw cow, goat and sheep milks. **Food Science Technology**. 40(2): 528-537, 2020.

BRANCO, M.A.A.C. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. 21(2): 393-408, 2003.

BRASIL, 2020. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico: Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil, 2016-2019**. 51(32): 27-31, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil – Informe 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt->

br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022. Acesso em: 12/01/2023.

BRASIL - Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2023. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha#:~:text=No%20Brasil%2C%20no%20per%C3%ADodo%20de,22.205%20hospitalizados%20e%20152%20%C3%B3bitos>. Acesso em: 10/01/2023.

CALLEBAUT, I. *et al.* HYR, an extracellular module involved in cellular adhesion and related to the immunoglobulin-like fold. **Protein Science**. 9:1382–1390, 2000.

CAMPAGNOLLO, F.B. *et al.* Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**. 92:370-379, 2018.

CAMPOS, F.M. *et al.* Presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A Production and Inactivation in Brazilian Cheese Bread. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 65: 2022.

CARDOSO, P, MARIN, J.M. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* in artisanal mozzarella cheese in Brazil: Risk factor associated with food workers. **Food Science Technology**. 37: 41-44, 2016.

CARNEIRO, L.A., PETTAN-BREWER, C. **Pesquisa em Saúde & ambiente na Amazônia perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região. Capítulo 13: One Health: Conceito, história e questões relacionadas- Revisão e Reflexão**. p.219-240. Editora Científica Digital. 2021.

CARRO, S. **Cheese production in Uruguay. In Fermented Foods from Latin America: From Traditional Knowledge to Innovative Applications**. CRC Press: Boca Raton, USA, 2017.

CASTRO, V.S. *et al.* Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: Pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 16: 1269-1280, 2017.

CATÃO, R.M.R., CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., total coliform, fecal coliform and *E.coli* raw and pasteurized milk on a dairy industry (Paraíba, Brazil). **Food Science and Technology**. 21(3): 281-287, 2001.

CAVALCANTE, J.F.M. *et al.* Processamento do queijo coalho regional empregandoleite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**. 27(1): 205-214, 2007.

CAVALCANTE, J.F.M. **Queijo coalho artesanal do Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 248p., 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2023. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Preventing Infections in Healthcare**.

Disponível em: <https://www.cdc.gov/mrsa/healthcare/inpatient.html>. Acesso em: 15/01/2023.

CERCA, N. *et al.* Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (*icaR*) by *SarA*, σ^b and *IcaR* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. 190 (19): 6530–6533, 2008.

CHALITA, M.A.N. *et al.* Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas** .39(6), 2009.

CHAGNOT, C. *et al.* Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. **Frontiers in Microbiology**. 4:1-26, 2013.

CHAIOUTIS, E. *et al.* Foodborne botulism: A brief review of cases transmitted by cheese products (Review). **Biomedical Reports**. 16(5): 2022.

CHEN, Q. *et al.* Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. **Microbiology Open**. 9(946)1-11, 2020.

CHOI, K.H. *et al.* Cheese Microbial Risk Assessments — A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 29(3): 307-314, 2016.

CHUNG, H.Y. *et al.* Molecular interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and chicken breast reveals enhancement of pathogenesis and toxicity for food-borne outbreak. **Food Microbiology**. 93: 106602, 2021.

COELHO S.M.O. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29: 369-74, 2009.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento 2022. **Análise Mensal – leite e derivados/ Julho 2022**. Brasília. 8p.

CONLON, K. M.H. *et al.* *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**. 184:4400–4408, 2002.

COSTA, C. F. *et al.* Short communication: Potential use of passion fruit (*Passiflora cincinnata*) as a biopreservative in the production of coalho cheese, a traditional Brazilian cheese. **Journal of Dairy Science**. 103(4): 3082-3087, 2020.

COSTA, F.N. *et al.* Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. 1-9, 2018.

CRAFT, K. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Medicinal Chemistry Communications**. 10: 1231-1241, 2019.

CUCARELLA, C. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**. 183(9): 2888-2896, 2001.

DEFRANCESCO, A.S. et al. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 114(29):1-10, 2017

DIAS, J. N. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Saúde e Pesquisa**. 8(2): 277-284, 2015.

DUARTE, D.A.M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**. 72(3): 297-302, 2005.

ELSAYED, M.S. et al. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. **Veterinary Word**. 8(9): 1051-1058, 2015.

EMBRAPA, 2022. **Setor lácteo deve crescer na próxima década, mas 2022 será de cautela**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/67714903/setor-lacteo-deve-crescer-na-proxima-decada-mas-2022-sera-de-cautela>. Acesso em: 13/01/2023.

EMBRAPA, 2023. **Abordagem de saúde única na pesquisa**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/visao-de-futuro/integracao-de-conhecimentos-e-de-tecnologias/sinal-e-tendencia/abordagem-de-saude-unica-na-pesquisa>. Acesso em: 19/01/2023.

EVENCIO-LUZ, L. et al. Occurrence of *Salmonella* sp. and coagulase-positive Staphylococci in raw eggs and coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's Northeast. **Brazilian Journal of Microbiology**. 1463-1466, 2012.

FANCELLO, F. et al. Antimicrobial activity of gaseous *Citrus limon* var *pompia* leaf essential oil against *Listeria monocytogenes* on *ricotta salata* cheese. **Food Microbiology**. 87, 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **One Health**. Disponível em: <https://www.fao.org/one-health/en/>. Acesso em: 19/01/2023.

FILHO, E.S.A.; FILHO, A.N. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. **Journal of Public Health**. 34(6):578-80, 2000.

FILHO, J.R.F. *et al.* Avaliação dos parâmetros físico químicos do queijo coalho artesanal produzido em Calçado – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. 6(1): 722-729, 2012.

FIOCRUZ, 2021. **Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia#:~:text=Os%20dados%20refor%C3%A7am%20uma%20preocupa%C3%A7%C3%A3o,conhecidos%20popularmente%20como%20'superbact%C3%A9rias'>. Acesso em: 12/01/2023.

FISHER E.L. *et al.* Basis of virulence in enterotoxin-mediated *Staphylococcal* food poisoning. **Frontiers in Microbiology**. 9:436, 2018.

FONSECA, B.C.P. *et al.* Avaliação microbiológica de produtos lácteos comercializados na cidade de Vitória da Conquista-Bahia. **Revista Saúde.com**. 12(2):575-583, 2016.

FONSECA, M.E.B. *et al.* Mastite bovina: Revisão. **PUBVET**. 15(2): 1-18, 2021.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**. 41(3): 430-449, 2017.

FOSTER, T.J. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**. 12(1): 49–62, 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 43-45, 2008.

FREITAS FILHO, J. R. *et al.* Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**. 6(8): 37-49, 2009.

FRIEDRICZEWSKI, A.B. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. **Acta Scientiae Veterinariae**. 46: 1-6, 2018.

FUSTÉ-FORNÉ, C.; MUNDET, L. A land of cheese: from food innovation to tourism development in rural. **Journal of Tourism and Cultural Change**. 1–19, 2020.

GEOGHEGAN, J.A. Role of Surface Protein SasG in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. 192(21): 5663–5673, 2010.

GILBERT, P. *et al.* Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 51: 245- 248, 2003.

GINDRI, L. **Comparação de metodologias para detecção da resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria/ RS. 2013.

GONÇANVES, J.L. *et al.* Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cow. **The Veterinary Journal**. 262, 2020.

GRASSO, E.M. *et al.* Cleaning and sanitation of *Salmonella*-contaminated peanut butter processing equipment. **Food Microbiology**. 46: 100-106, 2015.

GRISPOLDI, L. *et al.* *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. **Italian Journal of Animal Science**. 20(1): 677–690, 2021.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. 33(3), 2010.

HAABER, J. *et al.* Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**. 1-13, 2017.

HARAN K.P. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**. 50:688–695; 2012.

HEIR, E. *et al.* *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**. 275: 46–55, 2018.

HLEBA, L. *et al.* Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae genera and *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and Enteritidis isolated from milk, cheese and other dairy products from conventional farm in Slovakia. **Journal of Microbiology**. 1 (1): 1-20, 2011.

HUR, J. *et al.* Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. **Journal Food Research International**. 45: 819-830, 2012.

Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Disponível em:**
<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html#:~:text=Classifica%C3%A7%C3%A3o%3A%20O%20queijo%20de%20coalho,%25%20e%2060%2C0%25>. Acesso em: 13/01/2023.

IWATSUKI, K. *et al.* *Staphylococcus* cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**. 42(3): 203-214, 2006.

JOHLER, S. *et al.* Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. **Journal of Dairy Science**. 101 (4): 2915-2920, 2018.

KAHRAMAN, T. *et al.* Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in different cheese types produced in Turkey. **British Food Journal**. 112 (11): 1230-1236, 2010.

KALIA V.C. *et al.* Targeting Quorum Sensing Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilms: A Proteolytic Approach. In: Kalia V. (eds) **Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors**. Springer, Singapore (2018).

KAMIMURA, B.A. *et al.* Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects Compreh. **Food Science and Technology**. 18: 1636-1657, 2019.

KHAIRULLAH, A. R. *et al.* A Review of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on Milk and Milk Products: Public Health Importance. **Reviews in Pharmacy**. 11(7): 59-69, 2020.

KHAIRULLAH, A.R.A. Review of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) on Bovine Mastitis. **Systematic Reviews in Pharmacy**. 11(7): 172- 183, 2020.

KLUYTMANS, J.A.J.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency. **Clinical Microbiology and Infection**. 16(1): 11-15, 2010.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1760p.

KONING, J.W. **Interactions between *Streptococcus mutans* and *Veillonella dispar***. Tese de doutorado. University College London. 2010.

KOTZEKIDOU P. Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from univer-sity canteens. **Food Microbiology**. 34(2):337–343, 2013.

KUMARI, T. Adoption of management practices by the farmers to control sub-clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. 8(2): 924-927, 2020.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37(11):1261-1269, 2017.

LANGSRUD, S. *et al.* Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 51: 283 – 290, 2003.

LARSEN, J. *et al.* Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. 63: 1349-52, 2016.

LASA, I; PENÁDES, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**. 157: 99-107, 2006.

- LEE, S.H. *et al.* Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**. 91:88–91, 2017.
- LEHOTOVÁ, V. Quantitative Microbiological Analysis of Artisanal Stretched Cheese Manufacture. **Applied Science**. 11:1-17, 2021.
- LOBACZ, A. *et al.* Determination of the survival kinetics of *Salmonella* spp. on the surface of ripened raw milk cheese during storage at different temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**. 55: 610-618, 2020.
- MACHADO, M. A. A. *et al.* Antibiotic Resistance and Biofilm Production in Catalase-Positive Gram-Positive Cocci Isolated from Brazilian Pasteurized Milk. **Journal of Food Quality and Hazards Control**. 7: 67-74, 2020.
- MACK, D. *et al.* The Intercellular Adhesin Involved in Biofilm Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Is a Linear b-1,6-Linked Glucosaminoglycan: Purification and Structural Analysis. **Journal of Bacteriology**. 178: 175-183, 1996.
- MADDEN, R.H. *et al.* Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland. **Food Control**. 87: 70-78. 2018.
- MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos**. Portaria nº 352 de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário da República Federativa do Brasil, seção 01, p.76-78, 1996.
- MATA, E.E. *et al.* Detection and genotyping of *Listeria monocytogenes* in artisanal soft cheeses from Ecuador. **Revista Argentina de Microbiología**. 54(1): 2021.
- McEWN, S.A., COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**. 6(2): 2018.
- MEDEIROS, G. B. *et al.* Detection of mycobacteria in coalho cheese sold in Northeastern Brazil, **Ciências Agrárias**. 42(1): 439-446, 2021.
- MEHLI, L. *et al.* The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **International Dairy Journal**. 65: 20-27, 2017.
- MELO, F.D. *et al.* Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates recovered from raw milk and artisanal cheese. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 93(2), 2020
- MENDES, D.P.G. **Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados por bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho de Pernambuco**. Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, 2011.

MENDONÇA, J.F.M. *et al.* Detection of Viable Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus in Coalho Cheese by Real-Time PCR. **Food Science Technology**. 39(2): 690-696, 2019.

MENEGOTTO, F. R; PICOLI, S. U. MRSA, importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Research Gate**. 39(2): 147 - 150, 2007.

MENEZES, I.R. *et al.* Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 22(1): 58-63, 2015.

MODI, R. *et al.* Effect of Phage on Survival of Salmonella Enteritidis during Manufacture and Storage of Cheddar Cheese Made from Raw and Pasteurized Milk. **Journal of Food Protection**. 64(7): 927-933, 2001.

MONECKE, S. *et al.* Detection of mecC-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. **PLoS ONE**. 8(6): 1-6, 2013.

MONTEL, M. C. *et al.* Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Review. **International Journal of Food Microbiology**. 177: 136-154, 2014.

MORAES, G. M. D. *et al.* Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: microbiological, physicochemical and sensory attributes. **Food Science and Technology**, 94: 57-63, 2018.

MOUSSALLEM, B.C. *et al.* Detecção dos genes mecA e femA, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* Isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**. 2(2): 2-9, 2007.

MURUGESAN S, *et al.* Analysis of antibiotic resistance genes and its associated sccmec types among nasal carriage of methicillin resistant coagulase negative staphylococci from community settings, Chennai, southern India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 9:1–5; 2015.

NASCIMENTO, B.M. **Desenvolvimento e caracterização de queijos maturados: com leites caprino, bovino e misto**. Tese. Universidade Federal da Paraíba. 133p., 2017.

NASCIMENTO, G.B. **Uso do leite de descarte no aleitamento de bezerros**. Monografia. Pontífica Universidade Católica de Goiás. Curso de Zootecnia. 34p. 2022.

NASSU, R. T. *et al.* **Queijo de Coalho** – Agroindústria Familiar. EMBRAPA Informação Tecnológica. Brasília – DF, 2006.

NASSU, R.T. *et al.* Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 61(351): 303-305, 2006.

NIA, K.A. *et al.* Review over a 3-year period of European Union Proficiency Tests for detection of staphylococcal entero-toxins in food matrices. **Toxins (Basel)**. 8(4):107, 2016.

NORMANNO, G. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal Food Microbiology**. 117: 219-22, 2007.

NUNES, G. S. **Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos do queijo de coalho artesanalmente produzido**. Universidade Federal do Piauí. Dissertação do Mestrado, 2017.

O'GARA, J. P. *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. 270: 179–188, 2007.

ONO, K. *et al.* Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. **Applied and Environmental Microbiology**. 81(20) :7034–7040, 2015.

OPAS, 2022. **Relatório sinaliza aumento da resistência a antibióticos em infecções bacterianas em humanos**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2022-relatorio-sinaliza-aumento-da-resistencia-antibioticos-em-infeccoes-bacterianas>. Acesso em: 12/01/2023.

OTTO, M. *Staphylococcal* Biofilms. **Current Topics Microbiology Immunology**. 322: 207-228, 2008.

OXARAN, V. *et al.* *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, 68: 16–23, 2017.

PALACIOS, A. *et al.* Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Fresh, Soft Hispanic-Style Cheese — United States, 2021. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 71(21): 709-712, 2022.

PAPADOPOULOS, P. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. **Food Microbiology**. 69: 43-50, 2018.

PENATI, M. *et al.* Feeding pre-weaned calves with waste milk containing antibiotic residues is related to a higher incidence of diarrhea and alterations in the fecal microbiota. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 675, 2021.

PENNA, A.L. *et al.* Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**. 10(7): 2021.

PIERI, A. *et al.* Country Income Is Only One of the Tiles: The Global Journey of Antimicrobial Resistance among Humans, Animals, and Environment. **Antibiotics**. 9(8): 2-12. 473, 2020.

PLATA, K. *et al.* *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**. 56(4): 597-612, 2009.

PUI, C.F. *et al.* *Salmonella*: a foodborne pathogen. **Journal Food Research International**. 18: 465-473, 2011.

RANI, S.A. *et al.* Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. **Journal of Bacteriology**. 189 (11): 4223–4233, 2007.

RICKE, S.C. *et al.* Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. **Journal of Applied Microbiology**. 125: 313-327, 2018.

ROHDE, H. *et al.* Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**. 89:103–111, 2010.

ROLA J.G. *et al.* Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. **Journal Dairy Science**. 98:4273–4278; 2015.

ROLO J. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 67:1333–1341; 2012.

ROSARIO, A.L.S. *et al.* Shiga toxin–producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products from Bahia, Brazil. **Journal of Dairy Science**. 104(6): 6535-6547, 2021.

ROSENGREN, A. *et al.* Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**. 144(2): 263-269, 2010.

SANT'ANNA, F. M. *et al.* Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**. 70(4): 592- 601, 2017.

SANTANA, R.F. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializada em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 60(6): 1517-1522, 2008.

SANTOS, A.L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 43(6), 2007.

SANTOS, M. V. *et al.* Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina. In: IX Congresso Brasileiro Buiatria. Goiânia-GO. **Veterinária e Zootecnia**. 8: 131 – 137, 2011.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**. 15(12): 1468-1480, 2001.

SCHROEDER, K. *et al.* Molecular Characterization of a Novel *Staphylococcus aureus* Surface Protein (SasC) Involved in Cell Aggregation and Biofilm Accumulation. **PLoS One**. 4(10): 1-14, 2009.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **Queijos Nacionais: Estudos de Mercado**. SEBRAE/ESPM, 2008.

SEKHARAN, T. R. Biofilm – a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**. 6(7): 1778-1790, 2017.

SENOUSSI, A. *et al.* Formation and dynamics of aroma compounds during manufacturing-ripening of Bouhezza goat cheese. **International Dairy Journal**. 129: 2022.

SHIBATA, L. W. **Análise físico-química, microbiológica e sensorial do queijo de coalho condimentado produzido a partir do leite caprino congelado**. Universidade Federal do Paraíba. Dissertação de Mestrado, 2018.

SILVA, E. F. Physico- chemical characteristics and centesimal composition of rennet cheeses marketed in cities of Ceará. **Society and Development**. 10(2): 1-10, 2021.

SILVA, M.C.D. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicos de queijo coalho. **Revista Instituto Adolf Lutz**. 69(2): 214-221, 2010b.

SNITSER, O. Ubiquitous selection for *mecA* in community-associated MRSA across diverse chemical environments. **Nature Communications**. 11:6038, 2020.

SONG, X. *et al.* The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. **Veterinary Microbiology**. 247: 1-25, 2020.

SOUSA, M.L.F. *et al.* Avaliação microbiológica do queijo artesanal produzido e comercializado em uma cidade do interior da Paraíba. **Research, Society and Development**. 9(8): 2020.

SOUZA, M. V.; REIS, C; PIMENTA, F. C. Revisão sobre aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus*. **Revista de Patologia Tropical**. 34(1): 27 - 30, 2005.

STOODLEY, S. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. 56:187–209, 2002.

SUZUKI E. *et al.* Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrobiology Agents and Chemotherapy**. 37: 1219-1226, 1993.

TITOUCHE, Y, *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. **Journal Dairy Science**. 102(8): 6876-84, 2019.

TORMO, M.A. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**. 151: 2465–2475, 2005.

TORO, M. *et al.* Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. **Food Microbiology**. 75: 55-60, 2018.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 6^a ed.- Porto Alegre: Editora Artemed, 2002. ISBN 85-7307-678-X.

VASILEIOU, N.G.C. *et al.* Role of staphylococci in mastitis in sheep. **Journal of Dairy Research**. 86(3):254-266, 2019.

VÁSQUEZ-SANCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Chapter 5 – **Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus***. *Staphylococcus aureus*. 87-103, 2018.

VESTERGAARD M, *et al.* Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiology Spectrum**. 7(2):1-23, 2019.

VIVEHANANTHANA, K., LUPHZHYB, M.P.D.L. Detection of *mecA* Gene and Identification of Potential Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospital Wastewater Samples. **Advance Technology**. 1(1), 89-100, 2021.

WENDLANDT, S. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? **Annual Review of Food Science and Technology**. 4(1): 117-139, 2013.

WERNER, C. *et al.* Efficacy of homeopathic and antibiotic treatment strategies in cases of mild and moderate bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Research**. 77: 460-467, 2010.

WHITE, A.E. *et al.* Foodborne Illness Outbreaks Reported to National Surveillance, United States, 2009–2018. **Emerging Infectious Diseases**. 28(6): 1117-1127, 2022.

WHITNEY, E., ROLFES, S. **Nutrição: Entendendo os nutrientes**. Volume 1, 2008, 448p.

WOOD, D. S. *et al.* Source and persistence of *Salmonella muenster* in naturally contaminated Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, 47:20-22, 1984.

WOOLHOUSE, M. E. J.; WARD, M. J. Sources of Antimicrobial Resistance. **Science**. 341(6153): 1460–1461, 2013.

WU, S. *et al.* A Review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins** 2016, 8, 176.

ZEHRA. A. *et al.* Comparative analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) in community and food of animal origin. **FEMS Microbiology Letters**. 367(23): -12. 2020.

ZHANG, J. *et al.* Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. **Food Research International**. 162: 2022.

ZINSSTAG, J. *et al.* From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine**. 101(3-4): 148-156, 2011.

ZUIN, L.F., ZUIN, P.B. Produção de alimentos tradicionais contribuindo para o desenvolvimento local/regional e dos pequenos produtores rurais. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**. 4: 109-127, 2008.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo coalho industrial, caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de *Staphylococcus aureus* quanto a presença dos genes *femA*, *mecA*, *blaZ*, *sea* e *sed*, além de avaliar a capacidade *in vitro* de formação de biofilme e de resistência à antibióticos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta presente tese foram os seguintes:

- Avaliar microbiologicamente os queijos coalho comerciais e isolamento de *S. aureus* eventualmente presentes.
- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *S. aureus* dos queijos coalho, utilizando as provas bioquímicas como catalase, coagulase e fermentação do manitol;

- Avaliar o perfil de sensibilidade e resistência frente aos antibióticos β -lactâmicos;
- Caracterizar genotipicamente os isolados para confirmação da espécie *S. aureus*, avaliando a presença do gene *femA*;
- Caracterizar genotipicamente os isolados para confirmação da resistência aos β -lactâmicos, avaliando a presença do gene *mecA* e *blaZ*;
- Avaliar a capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócica, avaliando a presença do gene *sea* e *sed*;
- Avaliar *in vitro* da capacidade de desenvolvimento do biofilme e aderência a placa.

4. CAPÍTULO 1: Avaliação microbiológica de queijos coalho industrial

Os surtos de origem alimentar têm se tornado mais graves devido à globalização e ao comércio de alimentos entre os países, fazendo-se necessário que cada nação tenha suas regulamentações de segurança alimentar e controle efetivo de DTAs (LEE, YOON, 2021). As DTAs são responsáveis por mortes, problemas hepáticos, neurológicos e renais, além de apresentarem grande impacto econômico para a sociedade, indústrias agropecuárias e órgãos governamentais (FOCKER, VAN DER FELLS-KLERX, 2020).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), estima-se que 48 milhões de pessoas adoecem anualmente, 128 mil necessitam de hospitalização e 3 mil morrem. No Brasil, entre os anos de 2007 a 2020, foram notificados por ano, uma média de 662 surtos de DTA, envolvendo 156.691 doentes, 22.205 hospitalizados e 152 mortes (BRASIL, 2023). O aumento de casos e surtos de doenças transmitidas por alimentos, vem sido atreladas aos produtos elaborados a partir de animais, e dentre os casos, os patógenos mais envolvidos são *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, entre outros (HEREDIA, GARCÍA, 2008).

Existe uma grande variedade de queijos produzidos no Brasil refletindo aspectos históricos e culturais do país (KAMIMURA *et al.*, 2019). No território nacional, um dos queijos de maior expressão socioeconômica é o queijo de coalho, que se trata de um alimento de importância cultural e econômica, cujos métodos de fabricação são transmitidos de geração em geração seguindo uma tradição familiar (ARAGÃO *et al.*, 2022).

O queijo coalho é caracterizado por ser um queijo semiduro, de alta a média umidade e é obtido após a coagulação do leite cru ou pasteurizado e comercializado após dez dias de armazenamento (QUEIROGA *et al.*, 2013). Por ser um queijo fresco e com alto teor de umidade, este queijo apresenta prazo de validade limitado (entre 45 a 60 dias) e necessidade de cuidado nos processos de armazenamento para sua melhor conservação (LEANDRO *et al.*, 2021).

A segurança microbiológica do queijo depende de uma série de obstáculos que influenciam o crescimento, a sobrevivência e a inativação de microrganismos patogênicos, como a qualidade microbiológica do leite cru, a taxa e o grau de

acidificação durante a produção e a atividade de água (A_w) do produto final (WILLIS *et al.*, 2021), sendo que a contaminação cruzada do ambiente de fabricação também pode afetar a qualidade microbiológica do alimento (DONNELLY, 2018).

Desta forma, o objetivo do primeiro capítulo desta tese foi avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas comerciais de queijo coalho comercializadas em redes de supermercado das cidades de Araras-SP e Limeira-SP, segundo a Instrução Normativa – IN nº161, 1º de julho de 2022 e realizar a caracterização das amostras de queijo de acordo com o teor de umidade e Atividade Água (A_w).

4.1 Metodologia

4.1.1 Obtenção e identificação das amostras

Foram analisadas quatro marcas industriais de queijo tipo coalho disponíveis nos mercados da cidade de Araras e Limeira – SP, identificadas como A, B, C e D para a confidencialidade das amostras. Dentre as quatro marcas comerciais, foram avaliadas cinco unidades de cada lote, sendo consideradas amostras representativas ($n=5$), totalizando 20 amostras analisadas.

Apenas para fins comparativos em relação à influência do processamento térmico frente à qualidade microbiológica, foram analisadas 2 amostras de queijo coalho artesanal produzido sob encomenda, provenientes da cidade de Jundiaí – SP. A amostra identificada como E foi elaborada a partir de leite cru, e a amostra identificada como F foi elaborada a partir do leite termizado (65°C – 15 segundos).

4.1.2 Avaliação da atividade de água

Para avaliação da atividade de água (A_w), foi utilizado o equipamento digital Aqualab, modelo CX-2, fabricado pelo DECAGON. A determinação foi realizada em duplicata pelo “ponto de orvalho” que é medida diretamente quando ocorre o equilíbrio entre a água da amostra com o ar (vapor de água no espaço vazio da câmara de amostra) (XU *et al.*, 2019).

4.1.3 Avaliação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada pela técnica em secagem direta em estufa de 105°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Em placas secas,

pesou-se aproximadamente 2 gramas de queijo de coalho e colocou-as em estufa até atingir peso constante. A análise foi realizada em triplicata, e posteriormente aplicada a fórmula abaixo:

$$\% \text{ umidade} = 100 \times \frac{m(i) - m(f)}{m(i)}$$

Onde:

$m(i)$ = massa inicial

$m(f)$ = massa final

4.1.4. Enumeração de *Escherichia coli*

Para a contagem de *Escherichia coli*, foi adotado uso de Petrifilm® (3M Microbiology Products) analisando-se amostras em duplicata. Realizou-se três diluições seriadas de cada amostra (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) utilizando como diluente água peptonada 0,1%, e inoculou-se 0,1 mL na Placa 3M™, e incubou-se em estufa de 37°C por 24h. Posteriormente, realizou-se os cálculos e o resultado foi expresso em UFC/g.

4.1.5. Pesquisa de *Salmonella* ssp.

Para a pesquisa de *Salmonella* ssp. utilizou-se 225mL de Caldo Lactosado juntamente com 25g da amostra de queijo de coalho com incubação de 37°C por 24h para a etapa de pré-enriquecimento. Para a etapa de enriquecimento em caldos seletivo, utilizou-se o Caldo Tetracionato e Selenito Cistina e incubou-os a 37°C por 24h. Em seguida, foi realizado o plaqueamento diferencial nos meios de culturas Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), Ágar Hektoen Entérico (HE) e Ágar *Salmonella Shigella* (SS) com incubação a 37°C por 24h. Após, foi observado a presença de colônias características de *Salmonella* e repicadas em ágar semi-sólido inclinado contendo Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Triplice de Ferro (TSI) com incubação a 37°C por 24 horas. Para a verificação de ocorrência de reações típicas de presença de *Salmonella* foram aplicados os testes sorológicos, utilizando o Sorokit Probac® para *Salmonella* (ANDREWS, HAMMACK, 2007).

4.1.6. Enumeração de *Staphylococcus aureus*

Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), sendo que para o preparo da primeira utilizou-se como diluente 225mL de citrato de sódio 2%, juntamente com 25 gramas da amostra, homogeneizadas por 2 minutos em *stomacher* (Marca:SP-Labor/ Modelo SP-190) e as demais diluições foram realizadas a partir de água peptonada 0,1%.

Para as amostras de queijo coalho industrial foram inoculados 0,1mL de cada respectiva diluição em caldo TSB (Tryptona de Soja) suplementado com 10% de NaCl e 1% de Piruvato de Sódio e incubados por 48h a 37°C. Após a incubação, observou-se os tubos positivados e esgotou-se em meio Baird Parker (BP) suplementado com emulsão gema de ovo 1:1 e telurito de potássio 10% para confirmação das colônias características e incubou-se as em estufa de crescimento por 48h à 37°C (BENNETT e LANCETTE, 2001), os resultados foram expressos em NMP/g, conforme demonstrado pela Figura 12.

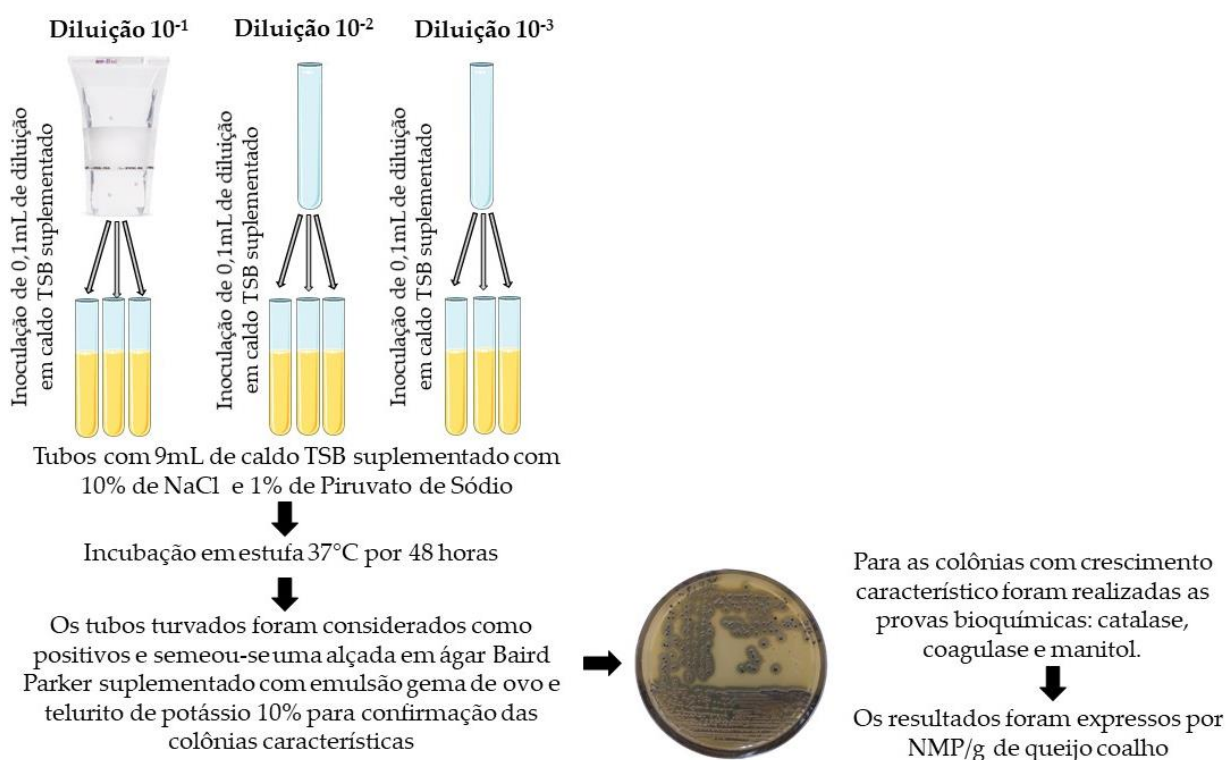


Figura 12. Representação de NMP/g para a estimativa de *Staphylococcus ssp* em queijos industriais (Autoria Própria).

Para as amostras artesanais, realizou-se as diluições seriadas conforme descrito anteriormente, e inoculou-se pela técnica de *Spread Plate* 0,1 mL da diluição com auxílio da alça de drigalski em meio BP suplementado com emulsão gema de ovo 1:1 e telurito de potássio 10% (BENNETT e LANCETTE, 2001). Após o período de incubação de ambos os queijos, observou-se as colônias com crescimento característico e realizou-se as provas bioquímicas como catalase, coagulase e fermentação do manitol. Os resultados das contagens de *S. aureus* em queijos artesanais foram expressos em UFC/g.

4.1.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Foi utilizada a metodologia USDA (HITCHINS, 2003) que compreende as etapas de enriquecimento seletivo primário, secundário, plaqueamento seletivo e provas bioquímicas. Para a etapa de enriquecimento primário, homogeneizou-se 25g da amostra com 225mL do Caldo Universidade de Vermont (UVM) e incubou-se a 30°C/24h. Após o tempo de incubação, para o enriquecimento secundário transferiu-se 0,1mL do caldo UVM para um tubo contendo 10mL de caldo Fraser, incubou-se a 35°C/24h. Observou-se o escurecimento do caldo e estriou-se uma alçada do caldo em placa de Ágar Oxford Modificado (MOX), e após 48h de incubação em 35°C, observaram-se as colônias típicas (esféricas e rodeadas por halo preto de hidrólise de esculina). Para a confirmação, foi realizada as seguintes provas bioquímicas: prova da catalase, teste da motilidade, teste de nitrato, reação em Ágar Tríplice Açúcar de Ferro, Teste da hemólise, Teste de Camp, fermentação da dextrose, xilose, ramnose, manitol e esculina.

4.1.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram avaliadas através do teste de variância Tukey utilizando o software SISVAR®. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1. Caracterização do queijo coalho - teor de umidade e atividade de água

Ao observar a Tabela 6, em relação ao teor de umidade, é possível observar que a média dos valores de teor de umidade expressa em porcentagem variou de 53,2% a 56,8% para as amostras industriais, e 46,9% e 48,7% para as artesanais, podendo ser classificado, segundo a Instrução Normativa – IN nº161, 1º de julho de 2022, queijos de muito alta umidade (acima de 55%) e queijo de alta umidade (acima de 46%), respectivamente.

Tabela 6. Média do Teor de Umidade (%) e Atividade de água (Aw) das quatro marcas de queijo coalho industrial (A, B, C e D) e das amostras artesanais (E e F)

Amostras	Teor de Umidade (%)	Atividade água (Aw)
A	56,8% a	0,9541 a
B	55,7% ab	0,9471 a
C	54,7 % bc	0,9523 a
D	53,2% c	0,9468 a
E	48,7% d	0,9866 a
F	46,9% d	0,9901 a

*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey- $p > 0,05$.

O valor médio de umidade das amostras de queijo coalho industrial sofreram diferença entre as marcas comerciais, sendo que a marca A apresentou percentual de umidade significativamente maior que as marcas C e D. Por outro lado, quando analisado apenas as amostras de queijo coalho artesanal, observa-se que as amostras E e F não apresentam diferença significativa entre elas, entretanto, o teor de umidade apresentada foi significativamente menor quando comparado as amostras industriais.

A diferença entre os teores de umidade de queijos pode ser justificada pelo modo de preparo do produto. Segundo Nassu *et al.* (2001), as variações entre a matéria-prima utilizada no processamento, tempo de prateleira, manuseio da coalhada e o tempo de prensagem e de maturação (quando for o caso), podem afetar a

composição centesimal como o teor de gordura e o teor de umidade, diferença que podemos notar ao comparar os queijos industriais e queijos artesanais.

Estudo realizado por Barroncas *et al.* (2019) analisando o teor de umidade de amostras de queijo coalho com registro de inspeção sanitária e sem registro, obtiveram uma variação de 44,9 a 51,7% e de 38,5 a 45,2%, respectivamente, fato este que corrobora parcialmente com o presente estudo, uma vez que os queijos industriais analisados apresentaram maior teor de umidade quando comparado as amostras artesanais.

Os valores obtidos pelo trabalho citado, estão de acordo com o estudo de Silva *et al.* (2010b), que ao analisar a umidade de queijo coalho proveniente de três laticínios do sertão de Alagoas, apresentaram umidade entre 45,5 a 51,5%, sendo caracterizado como queijo de média a alta umidade (39% a 55%), o que difere do presente estudo. Entretanto, teores de umidade classificados como alta ($>46\%$ e $< 55\%$) e muita alta ($<55\%$) conforme observado no presente trabalho, foram descritos por Vieira *et al.* (2003) e Freitas Filho *et al.* (2009).

O teor de umidade apresenta impacto direto na textura, sendo que os queijos de alta umidade possuem tendência de ter um aspecto mais frágil e textura granulada, enquanto que os queijos com teor mais baixo de umidade se apresenta mais firmes, secos e quebradiços (HENNELLY *et al.*, 2004), consequentemente, com menor teor de proteínas e disponibilidade de matéria orgânica para microrganismos heterotróficos (MORAES *et al.*, 2018).

De acordo com Food Safety Brazil (2018), durante o processo de maturação dos queijos, o teor de umidade, concentração de sal, pH e atividade água são fatores fundamentais para o controle de microrganismos patogênicos, sendo que, a perda de água é inevitável em tal processo, o que favorece o controle microbiológico.

A atividade água (A_w) também foi mensurada no presente trabalho conforme apresentado na Tabela 5. Quando observado os valores de atividade água para as amostras industriais e artesanais, nota-se que não obteve-se diferença significativa para este parâmetro, corroborando para os achados de Barros *et al.* (2019).

Os dados encontrados neste estudo nos mostram que todas as amostras analisadas apresentaram valores de A_w acima de 0,8, indicando a necessidade de uma atenção maior na produção e preservação dos queijos. Valores muito alto de A_w tornam os queijos mais susceptíveis à proliferação microbiana (SILVA *et al.*, 2021).

Contudo, a A_w pode ser controlada por processos físicos e químicos, assim como pela adição de alguns solutos, como o cloreto de sódio. Ermolaev *et al.* (2020) em estudos com amostras de queijos, observou-se que a A_w do produto sofre diminuição quando adicionado concentrações diferentes de cloreto de sódio, variando de 0,971 a 0,843, quando adicionado concentração de 1 a 4 mg/g, respectivamente.

Em estudo, Andrade (2006) analisando o perfil sensorial e aceitação de diversas amostras de queijo coalho, infere que as amostras industriais apresentam teor de atividade água superior às das amostras de produção artesanal, sendo de 0,968 e 0,955, respectivamente, entretanto, este fato não foi observado neste estudo.

Já Silva *et al.* (2021) avaliando as características físico-químicas dos queijos tipo coalho comercializado no Ceará, obtiveram uma variação de 0,697 a 0,714, dados estes significativamente menores ao encontrado no presente trabalho. Entretanto, Freitas Filho *et al.* (2009) e Sousa *et al.* (2014) encontraram valores de 0,970 e 0,890 a 0,960, respectivamente, o que se aproxima dos resultados aqui apresentados.

Outros parâmetros também podem interferir na Atividade Água. Segundo Freitas Filho *et al.* (2009), a umidade, pH, textura do produto e metabólitos de microrganismos pode causar alterações no valor de A_w .

4.2.2. Análise microbiológica do queijo coalho

Segundo a Instrução Normativa – IN nº161, 1º de julho de 2022, as amostras de queijo coalho caracterizada com o teor de alta umidade e muito alta, devem abranger a pesquisa microbiológica de alguns microrganismos patogênicos, como a contagem de *Escherichia coli*, *Estafilococos* coagulase positiva e *Salmonella* spp, conforme demonstrado nas Tabelas 7 e 8. As imagens das provas bioquímicas utilizadas para identificação de *S. aureus* estão representadas pela Figura 13.

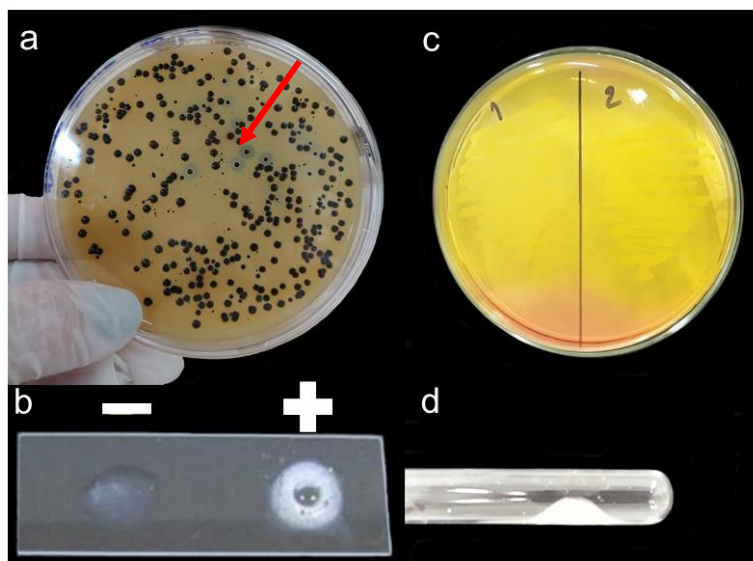


Figura 13. Provas bioquímicas para identificação de *S.aureus* dos isolados de queijos (a)→ colônia característica de *S. aureus* ; (b) prova da catalase; (c) fermentação do manitol; (d) prova da coagulase (Autoria Própria).

Observando a Tabela 7, nota-se que as amostras industriais identificadas como A, B, C e D apresentam-se de acordo com a legislação vigente considerando todos os microrganismos avaliados, tanto para os considerados planos de III classes (*Estafilococos* coagulase positiva e *Escherichia coli*), quanto o plano de II classes (*Salmonella* ssp), segundo a Instrução Normativa nº161. A enumeração de *Listeria monocytogenes* não faz parte da na atual legislação (IN nº161), entretanto, levando em consideração a relevância deste microrganismo e sua alta incidência em produtos lácteos, tais como queijo, foi realizado a pesquisa desse microrganismo e utilizou-se a antiga legislação como parâmetro (RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001), sendo que todas as amostras, sendo elas comerciais e artesanais, apresentaram-se de acordo devido à ausência de *L. monocytogenes* em 25g do produto.

De acordo com o plano de amostragem, os alimentos e/ou matérias primas avaliadas nos permitem inferir as condições microbiológicas do produto e nos permitem o julgamento sobre sua aceitação ou rejeição. Os planos de amostragem foram propostos em 1974 pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) e até nos dias atuais, sofre revisão e modificação (FOOD SAFETY BRAZIL, 2014).

Para o critério de aceitação ou rejeição do produto, se faz necessário avaliar o “n”, “c”, “m” e “M”, onde o n é caracterizado pelo número de unidade retiradas de um lote que será analisado (unidades amostrais), o c é o número máximo aceitável de

unidades do lote em que as contagens microbiológicas estão acima do limite mínimo (m), e o M é caracterizado sendo o limite máximo tolerado. Desta forma, para as amostras de queijo coalho avaliado, se faz necessário a contagem máxima de 10^3 UFC/g de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, entre uma e duas amostras avaliadas, respectivamente, e ausência em 25g do produto analisado para *Salmonella* ssp e *Listeria monocytogenes*.

Tabela 7. Pesquisa microbiológica das cinco unidades amostrais de queijo coalho industrial identificada como A, B, C e D.

Marcas	Unidades Amostrais	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> ssp	<i>Estafilococos</i> coagulase positiva (NMP/g)	<i>Listeria monocytogenes</i>
A	A1	3×10	Ausente	3×10	Ausente
	A2	3×10	Ausente	$1,1 \times 10^2$	Ausente
	A3	3×10	Ausente	3×10	Ausente
	A4	3×10	Ausente	3×10	Ausente
	A5	3×10	Ausente	$4,6 \times 10$	Ausente
B	B1	$1,9 \times 10^2$	Ausente	3×10	Ausente
	B2	3×10	Ausente	$4,6 \times 10$	Ausente
	B3	3×10	Ausente	$1,1 \times 10^2$	Ausente
	B4	3×10	Ausente	$1,1 \times 10^2$	Ausente
	B5	3×10	Ausente	3×10	Ausente
C	C1	3×10	Ausente	$< 2 \times 10$	Ausente
	C2	3×10	Ausente	$< 2 \times 10$	Ausente
	C3	3×10	Ausente	$< 2 \times 10$	Ausente
	C4	3×10	Ausente	$< 2 \times 10$	Ausente
	C5	3×10	Ausente	$< 2 \times 10$	Ausente
D	D1	3×10	Ausente	9×10	Ausente
	D2	6×10	Ausente	4×10	Ausente
	D3	3×10	Ausente	3×10	Ausente
	D4	3×10	Ausente	3×10	Ausente
	D5	3×10	Ausente	3×10	Ausente
Legislação*		n=5, c=1, m= 10^2 M= 10^3	n=5, c=0, m=Ausência**	n=5, c=2, m= 10^2 e M= 10^3	n=5, c=0, m=Ausência***

* Instrução Normativa – IN nº161, 1º de julho de 2022

** Ausência em 25g.

*** RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001.

Para as amostras artesanais (expressas na Tabela 8), pode-se observar que quando avaliado a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, os queijos identificados como E e F excederam o valor permitido ($2,1 \times 10^5$ UFC/g e $6,7 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente) quando comparada ao limite estipulado pela legislação (m= 10^2 e

M=10³ UFC/g, sendo o M é válido para amostras indicativas). Também pode-se observar que para a contagem de *Escherichia coli*, apenas a amostras E excedeu o limite determinado (M= 10³ UFC/g) apresentando contagens de 6,7x10³ UFC/g.

Tabela 8. Pesquisa microbiológica das amostras de queijo coalho artesanal identificada como E e F

Amostras	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella ssp</i>	<i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
E	6,7x10 ³	Ausente	2,1x10 ⁵	Ausente
F	5,2x10 ²	Ausente	6,7x10 ³	Ausente
Legislação*	n=5, c=1, m=10 ² M=10 ³	n=5, c=0, m=Ausência**	n=5, c=2, m=10 ² e M=10 ³	n=5, c=0, m=Ausência***

*Instrução Normativa – IN nº161, 1º de julho de 2022

**Ausência em 25g.

*** RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001.

Vale ressaltar que ambas as amostras foram produzidas sob encomenda e que uma utilizou-se para a produção do queijo o leite cru (amostra E), e a outra, utilizou-se o processo de termização para o tratamento do leite (amostra F). Destaca-se também que o queijo coalho obtido de leite cru deixou de ser produzido no Estado de São Paulo e interior de Minas Gerais e por isso não foi possível aumentar o número de amostras deste produto para a presente pesquisa. Ainda assim, os resultados obtidos com as amostras de queijos artesanais foram incluídos na tese, visando estabelecer uma comparação quali-quantitativa com as amostras de queijo coalho industrial. Os resultados obtidos reforçam o conhecimento amplamente estabelecido do importante papel da pasteurização e de Boas Práticas de Fabricação para garantia de qualidade microbiológica de queijos.

Os potenciais microrganismos patogênicos avaliados neste estudo, podem entrar em contato com o alimento de diversas maneiras, como diretamente no contato com úberes em animais infectados, contaminações do ambiente da fazenda leiteira e das instalações de produção das indústrias, ou ainda durante a manufatura e armazenamento do queijo (JAKOBSEN *et al.*, 2011).

As contagens de *Escherichia coli* e *Estafilococos* coagulase positiva em queijos geralmente ultrapassam o permitido pela legislação pois, segundo Le Marck *et al.*, (2009), os estafilococos possuem capacidade de se multiplicar rapidamente no leite

cru (8h a 25°C) e *E. coli*, por ser considerado um microrganismo indicador de falhas higiênicas sanitárias e indicador de contaminação fecal. Ombarak *et al.* (2016) infantiza que se a presença de *E. coli* encontrada em produtos lácteos não for de caráter patogênico, tais achados não oferece grandes riscos ao consumidor, contudo, se as células de *E. coli* isoladas possuem genes de virulência, elas apresentam risco à saúde dos consumidores.

Quando avaliado a presença de *Salmonella* ssp e *Listeria monocytogenes*, observamos que nenhuma das marcas dos queijos coalho industrial e nenhuma das duas amostras de queijo coalho artesanal apresentaram células viáveis das respectivas bactérias em 25g do produto analisado. Segundo Constanzo *et al.* (2020), a presença da microbiota do leite cru desempenha ação inibitória sobre *L. monocytogenes*, fato este que pode ser explicado quando avaliado o queijo identificado como E. De acordo com estudos do mesmo autor, quando avaliado a qualidade microbiológica de queijos elaborados com leite cru no varejo da Itália, dentre as 245 amostras de queijos, nenhuma foi positiva para *Salmonella* ssp e *L. monocytogenes*, fato este que corrobora para este estudo.

Em pesquisa, avaliando os padrões microbiológicos de queijo coalho com e sem registro comercializados na região Nordeste, Sousa *et al.* (2014) observaram que das 104 amostras analisadas, 100 apresentaram inconformidade com a legislação para a enumeração de Estafilococos coagulase positiva e 32 amostras apresentavam contagens que excediam a legislação vigente para coliformes termotolerantes.

Estudo de Pimentel (2019) que avaliou a qualidade microbiológica de 40 amostras de queijo coalho, sendo 20 amostras comercializadas em feiras e 20 amostras comercializadas em supermercados, relata que todas as amostras apresentaram contagens elevadas para a coliformes termotolerantes. Em relação a contagem de Estafilococos coagulase positiva, 20% das amostras provenientes das redes de supermercado e 60% das amostras provenientes de feiras livres, apresentaram contagens acima do permitido pela legislação.

A qualidade microbiológica de queijo coalho comercializada na região metropolitana de Recife, foi relatada por Torres (2022), observando-se que de seis amostras (três amostras industriais e três amostras artesanais), apenas uma (amostra industrial), estava de acordo com a legislação vigente respeitando os valores máximos para a contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e ausência de *Salmonella*.

Através destes relatos, é possível inferir que, embora o queijo coalho apresente relevância cultural e socioeconômica, este alimento pode estar vinculado à DTAs, principalmente quando sua produção é feita de forma artesanal.

A contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos pode ocorrer em diversas etapas da cadeia de produção do queijo. Algumas práticas podem contribuir para amenizar os riscos de contaminação e/ou proliferação microbiana, como a higienização dos úberes do rebanho leiteiro, bem como todos os equipamentos utilizados durante a ordenha, controle de temperatura dos tanques de armazenamento e rigoroso controle do binômio tempo x temperatura de pasteurização (BALDUINO *et al.*, 2021).

4.3 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que todas as marcas comerciais de queijo coalho analisadas apresentaram contagens microbiológicas dentro dos padrões estipulado pela legislação vigente.

Pode-se observar também que a qualidade microbiológica dos queijos sofre influência pelo tratamento térmico do leite e condições de processamento, pois embora as amostras comerciais tenham apresentado resultados satisfatórios em relação aos parâmetros higiênico-sanitários, as amostras de queijo coalho artesanais (tomadas para fins comparativos) apresentaram impróprios para consumo devido a contagens inadequadas para *Estafilococos coagulase positiva* e de *E. coli*.

4.4 Referência bibliográfica

ANDRADE, A.A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico de aceitação de queijo de coalho produzido no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 138 f. 2006.

ANDREWS, W. H., HAMMACK, T. S. “*Salmonella*,” **Food and Drug Administration, In Bacteriological Analytical Manual**, 8th edition, 2007, <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM309839.pdf>

ARAGÃO, B.B. *et al.* *Staphylococcus* spp. multirresistente em leite de cabra: um sério problema de Saúde Única. **Medicina Veterinária**. 16 (2): 136-151, 2022b.

BALDUINO, B.A. *et al.* **Evaluation of the microbiological quality of coalho cheeses commercialized in Lavras - MG**. Anais Congresso Internacional da Agroindústria – Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria. 2021.

BARRONCAS, J.S. *et al.* Aflatoxin M1 in cheese samples from the Amazon Region. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 13(13): 163-169, 2019.

BARROS, D. M. *et al.* Queijo de coalho com quitosana incorporada e como revestimento: efeito na viabilidade de *Staphylococcus aureus* e aceitação sensorial. **Ciências Agrárias**. 40(6): 3477-3492, 2019.

BENNETT, R.W., LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**, 8 ed. Estados Unidos: Food and Drug Administration, 2001, cap. 12.

BRASIL - Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2023. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha#:~:text=No%20Brasil%2C%20no%20per%C3%ADodo%20de,22.205%20hospitalizados%20e%20152%20%C3%B3bitos>. Acessado em: 10/01/2023.

CONSTANZO, N. *et al.* Foodborne Pathogen assessment in raw milk cheeses. **International Journal of Food Science**. 2000, 200.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance resource center. Estimates of foodborne illness in the United States**, 2018. <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acessado em 29 de dezembro de 2022.

DONNELLY, C. **Review of controls for pathogen risk in Scottish artisan cheese made from unpasteurised milk** (2018). <https://www.foodstandards.gov.scot/publications-and-research/publications/control-of-pathogens-in-cheeses-made-from-unpasteurised-milk>. Acessado em 17 de dezembro de 2022.

ERMOLAEV, V. A. Analysis of the cheese components' influence on the dehydration process under reduced pressure. **BIO Web of Conferences**, 27:1-5, 2020.

FOCKER, A, FELS-KLERX, V. D. Economics applied to food safety. **Current Opinion in Food Science**, 36: 18-23, 2020.

FOOD SAFETY BRAZIL, 2018. **A maturação e a qualidade microbiológica de queijo**. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/maturacao-e-qualidade-microbiologica-de-queijos/>. Acesso em 23/01/2023.

FOOD SAFETY BRAZIL, 2014. **Análise microbiológica de alimentos: importância do plano de amostragem**. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/analise-microbiologica-de-alimentos-importancia-do-plano-de-amostragem>. Acesso em: 24/01/2023.

FREITAS FILHO, J. R. *et al.* Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**. 6(8): 37-49, 2009.

HENNELLY, P. J. *et al.* Increasing the moisture content of imitation cheese: effects on texture, rheology and microstructure. **European Food Research and Technology**. 220 415-420, 2005.

HEREDIA, N., GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**. 4:250–255, 2018.

HITCHINS, A.D. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: **Bacteriological Analytical Manual**, 7 ed. Estados Unidos: Food and Drug Administration, 2003, cap.10p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN No. 161, 1 de julho de 2022. Diário Oficial da União. <https://in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acessado em 24 de agosto de 2022.

JAKOBSEN, A.R. *et al.* Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology** 28: 492-496, 2011.

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

LE MARC, Y. *et al.* Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**. 129(3): 306-311, 2009.

LEANDRO, G.R. *et al.* Quality and safety of the Coalho cheese using a new edible coating based on the Ziziphus joazeiro fruit pulp. **Future Foods**. 4, 2021.

LEE, H., YOON, Y. Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. **Food Sci Anim Resour.** 41(1): 1–7, 2021.

MORAES, G.M.D. *et al.* Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes. **Food Science and Technology.** 94: 57-63, 2018.

NASSU, R.T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar.** 15(29):28-36, 2001.

OMBARAK, R.A. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology.** 221: 69-76, 2016.

PIMENTEL, E. T. **Qualidade de queijo coalho comercializado em Manaus**, AM. Manaus, 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Faculdade de Ciências Agrárias, UFAM, 2019.

QUEIROGA, R.C.R.E. *et al.* Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture LWT - **Food Science Technology** 50: 538-544, 2013.

RDC – Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nº12, 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.**

SILVA, E. F. Physico- chemical characteristics and centesimal composition of rennet cheeses marketed in cities of Ceará. **Society and Development.** 10(2): 1-10, 2021.

SILVA, M.C.D. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo coalho. **Revista Instituto Adolf Lutz.** 69(2): 214-221, 2010b.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Metodologia de Análises Microbiológicas de Água e Alimentos.** 4ed. São Paulo. Livraria Varela, 2010a.

SOUSA, A. Z. B. *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto. Biológico.** 81: 30-35, 2014.

TORRES, M.V.S. **Estudo de parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Queijos Coalho Industrializados e Artesanais, comercializados na Região Metropolitana de Recife-PE.** Monografia - Curso de Graduação em Química Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, 2022.

VIEIRA, M.L.M. *et al.* Avaliação de laudos analíticos de queijo coalho, à luz das Legislações Federal e Estadual de Pernambuco. **Revista Higiene Alimentar**. 17(109): 19-23, 2003.

XU, J. *et al.* High temperature water activity as a key factor influencing survival of *Salmonella* Enteritidis PT30 in thermal processing. **Food Control**. 98: 520-528, 2019.

WILLIS, C. *et al.* Assessment of the Microbiological Quality and Safety of Unpasteurized Milk Cheese for Sale in England between 2019 and 2020 . **Journal of Food Protection**. 85 (2): 278–286. 2022.

5. CAPÍTULO 2: Genes codificadores de enterotoxinas, resistência antimicrobiana e capacidade de formação de biofilmes de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de queijo coalho

Nos últimos anos, a fabricação do queijo coalho passou por melhoramentos tecnológicos, devido às exigências de higiene e do processo de pasteurização da matéria-prima, sem influenciar nas características sensoriais do produto final (ABIQ, 2022). Contudo, a microbiota dos queijos é rica em diversas espécies de fungos e bactérias, podendo influenciar na qualidade microbiológica, vida útil e segurança deste alimento (BROOKS *et al.*, 2012).

Outro fator alarmante sobre a qualidade microbiológica dos queijos é a possível presença do patógeno *Staphylococcus aureus*, que se encontra entre os mais frequentes causadores de mastites estafilocócicas em todo o mundo (ABREU *et al.*, 2021), sendo associado às maiores perdas econômicas devido a sua alta patogenicidade, infecção persistente, baixas taxas de curas e sua resistência aos tratamentos a base de antibióticos (RAINARD *et al.*, 2018).

O *S. aureus* além de ser um patógeno de grande interesse no contexto alimentar, é colonizador assintomático da pele e fossas nasais de humanos, tendo aproximadamente 30% dos indivíduos colonizados permanentemente é o principal causador de infecções cutâneas, infecções em tecidos moles e bacteremia, o qual é responsável por altas taxas de mortalidade e comprometimento severo em mais de um terço dos sobreviventes (KWIECINSKI, HORSWILL, 2020).

Frente a estas infecções, assim como na medicina humana, o emprego de antimicrobianos vem ganhando destaque na pecuária veterinária, sendo utilizado como agente terapêutico para o controle e tratamento de diversas afecções e como promotores de crescimento e ganho de peso dos animais de produção, contudo, o uso desta classe de fármacos, tem originado resistência antimicrobiana, para humanos e para animais (VIDOVIC, VIDOVIC, 2020).

A resistência frente à antibióticos ao longo da cadeia alimentar é uma grande preocupação global em saúde pública, pois os animais podem ser carreadores de cepas resistentes aos antibióticos, disseminando a resistência horizontal na comunidade (FOUNOU *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2020), uma vez que já é descrito na literatura o conceito *One Health*, o qual aponta e comprova a estreita conexão entre

seres humanos, animais, plantas e o ecossistema como um todo (ZHOU *et al.*, 2022).

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é o principal patógeno humano que apresenta maior virulência e resistência a diferentes antibióticos, responsáveis por desencadear inúmeras infecções (BARCUDI *et al.*, 2020). Outro fator agravante é a capacidade dos isolados de MRSA oriundos de leites e derivados lácteos em transportar genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas (BASANISI *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2019; TITOUCHE *et al.*, 2019) e também outros genes de virulência, como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), e a capacidade de formação de biofilmes (genes *icaA* e *icaD*) (FILIPELLO *et al.*, 2019; NORMANO *et al.*, 2020; ZAYDA *et al.*, 2020).

Considerando o agravante e a grande incidência deste patógeno em produtos lácteos tais como o queijo, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus aureus* em queijo coalho, genes codificadores de toxina dos isolados obtidos e avaliação (*in vitro*) da capacidade de formação de biofilmes.

5.1 Metodologia

5.1.1 Obtenção dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Os isolados foram obtidos a partir da pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva através do método de NMP/g utilizando o caldo TSB suplementado, avaliando quatro marcas industriais (identificadas como A, B, C e D) comercializadas nas redes de supermercado da cidade de Araras/SP e Limeira/SP, e dentre as quatro marcas comerciais foram avaliadas cinco unidades de cada lote, sendo consideradas amostras representativas (n=5), totalizando 20 amostras analisadas.

Também foi realizado a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva de duas amostras de queijo coalho artesanal, produzido sob encomenda, proveniente da cidade de Jundiaí- SP. Os queijos artesanais foram identificados como amostra E e F, sendo que a amostra E foi elaborado com leite cru e a amostra F, com leite termizado (65°C a 15 segundos). A enumeração para as amostras de queijo artesanal, foram realizadas conforme descrito por Bennett e Lancette (2001), utilizando o plaqueamento em ágar Baird Parker suplementado e o resultado foi expresso em UFC/g (conforme descrito no Capítulo 1). Para as colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp obtidas, tanto das amostras artesanais quanto industriais, foi realizado o teste da catalase,

coagulase e fermentação do manitol para a confirmação da espécie *S. aureus*. Dos isolados obtidos foram realizadas as etapas de susceptibilidade antimicrobiana, detecção de genes de resistência e de genes codificadores de enterotoxina estafilocócica.

5.1.2 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

Para os isolados confirmados como *S. aureus*, foi realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), que foi determinado pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), afim de classificar os antibióticos como resistentes, sensíveis ou intermediários frente aos isolados (Tabela 9), como demonstrado na Figura 14. Os seguintes antimicrobianos (OXOID®) foram testados: Cefoxitina (CFO 30µg) – pertencente ao grupo dos β-lactâmicos, Eritromicina (ERI 15µg)- pertencente ao grupo dos macrolídeos, Gentamicina (GEN 10µg)- pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, Oxacilina (OXA 1µg) – pertencente ao grupo dos β-lactâmicos e Vancomicina (VAN 30µg) – pertencente ao grupo dos glicopeptídeos. A cepa de referência *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle.

Tabela 9. Halos de interpretação do teste TSA

Antibióticos	Concentração (µg)	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefoxitina	30µg	≥ 20mm	-	≤ 19mm
Eritromicina	15µg	≥ 23mm	14 a 22mm	≤13mm
Gentamicina	10µg	≥ 15mm	13 a 14mm	≤12mm
Oxacilina	1µg	≥ 13mm	10 a 12mm	≤9mm
Vancomicina	30µg	≥ 15mm	-*	-*

Fonte: Adaptado de CLSI (2005). (*representa que não há documentado antibiótico intermediário ou resistente, sendo que todos que apresentam halo menor ou igual a 15mm é considerado resistente).



Figura 14. Teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão (Autoria Própria)

5.1.3 Extração de DNA

As colônias características do Agar BP foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI - Disco, Becton Dickinson, MD) a 37°C por 24h. Com a amostra na concentração de 2×10^9 UFC/mL, a extração do DNA foi realizada com o kit comercial Purelink Genomic DNA (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e verificado quanto à sua pureza usando equipamento nanodrop (Thermo Scientific). O material genético extraído foi armazenado a -80°C.

5.1.4 Detecção de genes de resistência por PCR

A detecção de genes que codificam mecanismos de resistência foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *mecA* e o gene *femA* (presente no metabolismo celular) conforme descrito por Teixeira *et al.* (2014), e o gene *blaZ*, descrito por Ferreira *et al.* (2017) (Tabela 10). A amplificação por PCR foi detectada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 10. Iniciadores de PCR para amplificação de genes *mecA* e *blaZ*

Gene	Primers	Sequencia (5'- 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>mecA</i>	Forward	GTT CTG CAG TAC CGG ATT TGC	532 pb
	Reverse	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	
<i>femA</i>	Forward	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132 pb
	Reverse	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	
<i>blaZ</i>	Forward	CAA AGA TGA TAT AGT TGC TTA TTC TCC	421pb
	Reverse	TGC TTG ACC ACT TTT ATC AGC	

De acordo com a metodologia adaptada de Teixeira *et al.* (2014), o volume final da reação de PCR foi de 20 µL. Foram utilizados 4µL de Taq Polimerase 5x FIREPol® Master Mix 12,5mM, 0,5 µL de cada iniciador (10 µM), 1 µL de DNA (1-10ng/µL) e completados com 14 µL de água livre de nucleases. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 57°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para cada par de *primers* foi preparada uma reação com água em vez do DNA como controle negativo.

5.1.5 Avaliação dos genes codificadores de enterotoxina estafilocócica

A detecção de genes de enterotoxina foi determinada por PCR. Foram utilizados *primers* específicos para detectar genes *sea* e *sed* (PEREIRA *et al.*, 2017) (Tabela 11). As cepas FRI100 (*sea*) e FRI472 (*sed*), foram usadas como controles positivos, generosamente cedidas por D. Doro e T. C. Oliveira da Universidade Federal de Londrina, Brasil.

Tabela 11. Iniciadores de PCR para amplificação de genes *sea* e *sed*

Gene	Primers	Sequência (5'- 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>sea</i>	Forward	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127pb
	Reverse	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
<i>sed</i>	Forward	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319pb
	Reverse	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	

O volume final da reação da PCR foi de 20 µL conforme descrito anteriormente. A amplificação para estes *primers* foi realizada utilizando o termociclador com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para cada par de primers foi preparada uma reação com água em vez do DNA para controle negativo.

5.1.6 Capacidade de formação de biofilmes – teste quantitativo *in vitro*

Os isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos das amostras de queijo coalho industrial e artesanal (para fins comparativos) foram inoculados em caldo TSB enriquecidos com 5% de glicose e incubados a 37°C por 24 horas. O volume de 200µL de cada cultura foi adicionada a microplaca de 96 poços e incubada a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e realizou-se três lavagens dos poços com 200µL de água destilada esterilizada. Secou-se a placa a temperatura ambiente e adicionou-se 100µL de corante Cristal de Violeta (Laborclin®) e deixou-se em temperatura ambiente por 3 minutos. Realizou-se mais três lavagens com água destilada estéril. Após a secagem, 200µL de álcool acetona (80:20) foi adicionada e a densidade óptica foi mensurada a 595nm em leitor de absorbância 800™ TS Biotek®. Para controle positivo, utilizou-se *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 e controle negativo, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC) 12228, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2019).

A interpretação da capacidade de produção de biofilme foi classificada como sendo:

- sem capacidade de produção ($A_{do} \leq A_{CN}$);
- produção fraca ($A_{CN} < A_{do} \leq 2 \times A_{CN}$);
- produção moderada ($A_{CN} < A_{do} \leq 4 \times A_{CN}$);
- produção elevada ($A_{do} > 4 \times A_{CN}$);

Sendo: A_{do} = absorbância da densidade óptica da amostra; A_{CN} = absorbância do controle negativo.

5.1.7 Análise quantitativa de bactérias totais

Para a análise quantitativa, foi realizado um *pool* dos queijos industriais (A, B, C e D), totalizando apenas em uma amostra e um *pool* dos queijos artesanais (E e F), e o DNA bacteriano foi extraído utilizando o kit QIAamp Fast DNA Stool®, conforme as recomendações do fabricante.

A microbiota das amostras de queijos industriais e artesanais foram confirmadas por PCR em tempo real (qPCR) utilizando os *primers* específicos (Tabela 12) (MATSUKI *et al.*, 2004) e SYBR Green (Bio-Rad®) utilizando o equipamento LightCycler® 480 (Roche Diagnostics).

Os primers utilizados para a amplificação do DNA das amostras também foram empregados para a construção da curva padrão em diferentes concentrações, sendo elas de 10^1 à 10^4 UFC/mL. O DNA de bactérias não alvos do estudo foram utilizadas como controle negativo (POSSEMIERS *et al.*, 2006).

Tabela 12. Sequência de nucleotídeos dos primers e tamanhos esperados dos amplicons para análise quantitativa de bactérias totais

Sequência (5' – 3')	pares de base (pb)
ACT CCT ACG GGA GGC AGC A	200 pb
ATT ACC GCG GCT GCT GG	

Fonte: Adaptado de Matsuki et al. (2004).

5.1.8 Análise estatística

A quantificação de bactérias totais por qPCR foi apresentado pela média $\pm$ desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram avaliadas através do teste de

variância (ANOVA), utilizando o software GraphPad Prism 5. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Confirmação dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Após a realização dos testes bioquímicos para confirmação da espécie *S. aureus*, vinte e nove isolados (29) foram identificados, sendo 4 isolados da marca industrial A, 13 da marca industrial B, 2 da marca industrial D, 5 isolados da amostra artesanal E e 5 da amostra artesanal F. A marca C não teve nenhum isolado de *Staphylococcus aureus* identificada.

Os estafilococos constituem um grupo heterogêneo de microrganismos e são considerados patógenos oportunistas responsáveis por intoxicação alimentar e suas espécies são divididas pela capacidade ou não da produção da coagulase: Estafilococos coagulase-positivo (CPS) e Estafilococos coagulase-negativo (CNS), sendo que os isolados de CNS é considerada menos patogênica quando comparada aos CPS por apresentarem menos fatores de virulência (CHAJEÇA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2023). A coagulase é uma enzima que está envolvida na coagulação do sangue, sendo capaz de fazer a conversão catalítica do fibrinogênio em fibrina, resultando na formação do coágulo sanguíneo (KHUSRO, AARTI, 2022).

Na literatura são descritos 53 espécies de estafilococos, sendo que 40 espécies e 24 subespécies foram categorizadas como CNS. Dentre as classificadas como CPS, destacam-se *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (MELO *et al.*, 2020; BECKER *et al.*, 2014). Os alimentos derivados do leite, são frequentemente associados a presença de CPS, principalmente pela espécie *S. aureus* (CHENOUF *et al.*, 2021), sendo que sua alta prevalência em alimentos é atribuída pela facilidade de se difundir entre os manipuladores de alimentos, superfícies e durante o processo de embalagem, além de serem tolerantes a diversos fatores ambientais (CHAJEÇA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2014).

5.2.2 Análise genotípica dos isolados de *Staphylococcus aureus* (gene *femA*)

Como prova confirmatória, para todas as amostras identificadas como *S. aureus* pelos testes bioquímicos, tanto amostras industriais quanto artesanais, foi realizado a

análise molecular utilizando como ferramenta a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) avaliando o gene *femA* (Figura 15 e Figura 16).

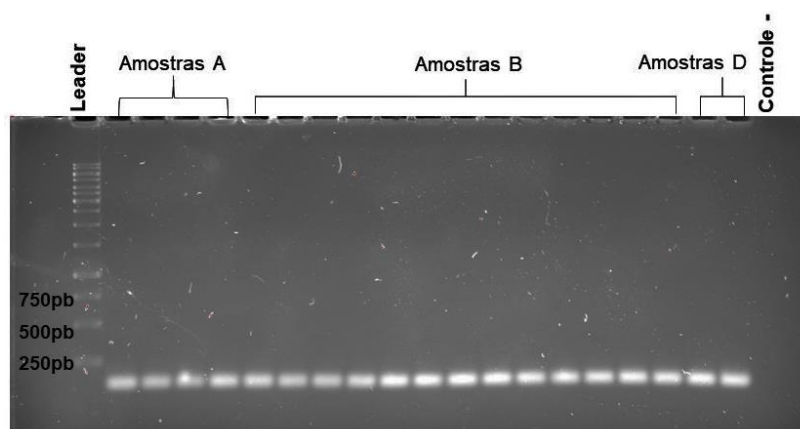


Figura 15. Detecção do gene *femA* (amplicon 132pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

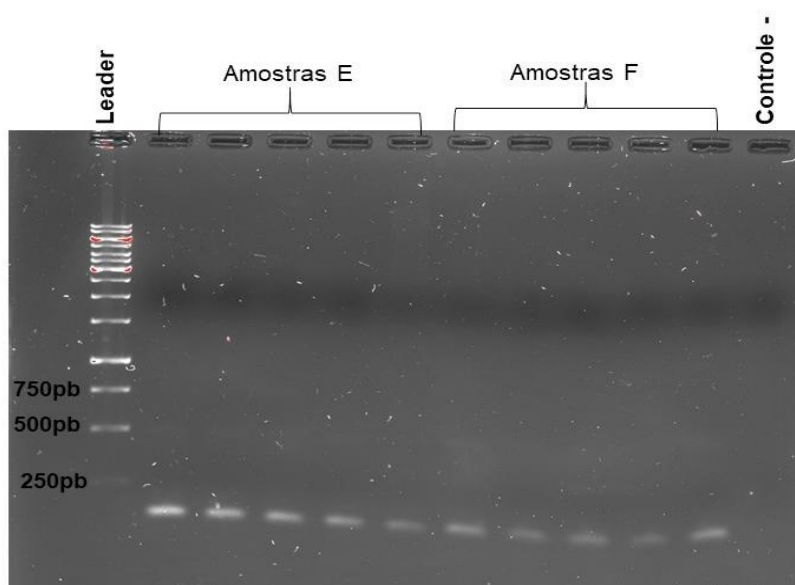


Figura 16. Detecção do gene *femA* (amplicon 132pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

Conforme apresentado na Figura 15 e 16, todos os isolados avaliados (19 isolados das marcas industriais e 10 isolados das amostras artesanais), apresentaram o gene *femA*, conforme tamanho do amplicon esperado, corroborando com os resultados das provas bioquímicas realizadas para a caracterização inicial, tais como: catalase, coagulase e fermentação do manitol.

As análises moleculares, avaliando genes específicos como marcadores ou identificadores de genomas de microrganismo é imprescindível para uma análise fidedigna, uma vez que provas bioquímicas podem sofrer influências do ambiente apresentando resultados falsos-positivos. A identificação molecular da espécie *S. aureus* através do gene *femA*, é de extrema confiabilidade, uma vez que se trata de uma proteína codificada geneticamente por este microrganismo cuja qual apresenta de 48-50kDa, estando envolvida na estrutura da parede celular bacteriana (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

A identificação do gene *femA* é relatado por autores (COSTA, 2008; DIAS *et al.*, 2011) como marcador epidemiológico, principalmente quando avaliado em amostras provenientes de leite, indicando incidência de infecções intramamárias, enfatizando a relevância de estudo deste gene.

Em estudos de Pelisser *et al.* (2009), que avaliaram 102 isolados de característicos de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos comerciais, observaram que apenas 91 isolados (89,2%) apresentaram o gene *femA* utilizado como prova molecular para identificação da espécie *S. aureus*, sendo que os demais isolados se tratavam de espécies CNS. Entretanto, relatos de Andrade *et al.* (2019), demonstraram que a espécie *Staphylococcus aureus* estavam presentes em todas as amostras de queijo coalho artesanal e industrial analisadas, comercializada nos mercados de Fortaleza, corroborando para os achados deste presente trabalho.

A presença de *Staphylococcus aureus* em alta frequência em queijos e derivados lácteos é uma forte indicação de uma segurança microbiológica comprometida nas cadeias de produção leiteiras, onde as falhas podem ocorrer nas etapas de obtenção do leite ou nas etapas de fabricação do queijo. Pesquisas relevam que na cadeia produtiva de alimentos pode ocorrer a disseminação de agentes infecciosos e transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos, ameaçando a saúde humana e animal (ARAGÃO *et al.*, 2022).

5.2.3 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

Afim de avaliar tal capacidade, para os isolados dos queijos industriais e artesanais confirmadas pelas provas bioquímicas e pela presença do gene *femA*, foi realizado o teste de susceptibilidade aos antibióticos afim de investigar presuntivamente quais dos isolados pertenciam a classificação de MRSA, como demonstrado Figura 17.

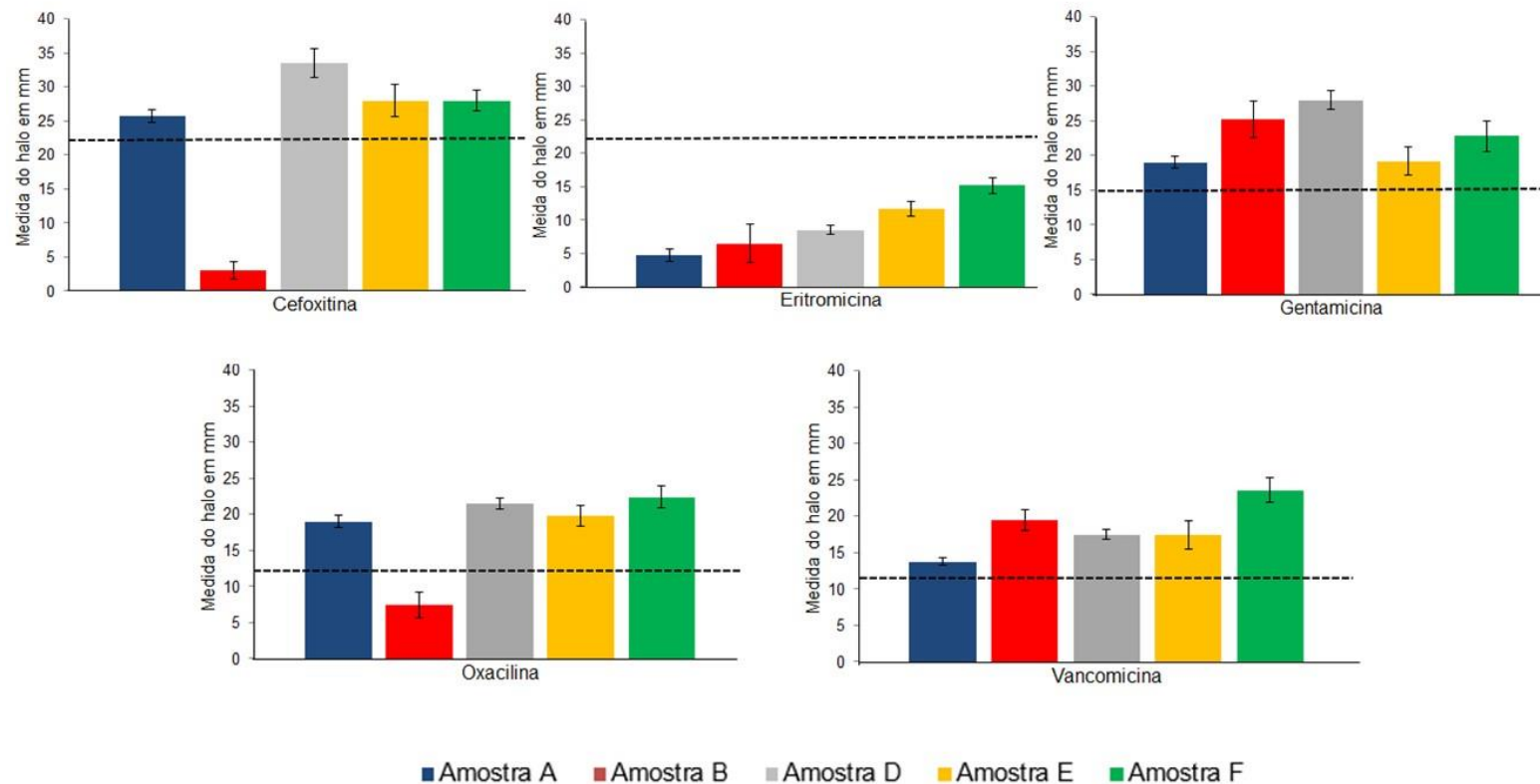


Figura 17. Perfil de sensibilidade e resistência dos isolados *S. aureus* em queijos, frente aos antibióticos

Os isolados provenientes da mesma amostra, apresentaram o mesmo perfil de resistência e sensibilidade, sendo representado pela média. Referência: CFO- Sensível: ≥ 20 mm/ Resistente: ≤ 19 mm; ERI- Sensível: ≥ 23 mm/ Resistente: ≤ 13 mm; GEN- Sensível: ≥ 15 mm/ Resistente: ≤ 12 mm; OXA – Sensível: ≥ 13 mm/ Resistente: ≤ 9 mm/ VAN- Sensível: ≥ 15 mm/ Resistente: < 15 mm. A linha horizontal traçada (-----) representa o valor de referência dos antibióticos, sendo que, acima da linha considera-se sensível ao antimicrobiano e abaixo da linha, considera-se resistente.

Pode-se observar que dentre as amostras comerciais e artesanais analisadas, ambas apresentam o mesmo perfil de sensibilidade e resistência frente aos antibióticos, exceto a amostra industrial identificada como B, que apresentou resistência a cefoxitina e oxacilina, o que difere das outras amostras.

Ao observar o teste de susceptibilidade, destaca-se que 100% dos isolados eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, sendo que todos os isolados apresentaram resistência à eritromicina, pertencente ao grupo dos macrolídeos, ou seja, apresentaram o halo de inibição menor que 13mm.

Os macrolídeos são importantes agentes antimicrobianos de amplo espectro na medicina humana e veterinária, e seus genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente através de linhagens, espécies ou gêneros (KRÜGER *et al.*, 2022).

A resistência frente ao antibiótico pertencente a classe dos macrolídeos se dá pelo mecanismo de metilação do sítio ribossômico de antibióticos mediada pela presença do gene *erm*, o qual atualmente existem mais de vinte classes diferentes. A presença do gene *msr* também vem sendo associado a resistência frente aos macrolídeos, sendo que o gene *msr (C)* é o que mais está documentado ao grupo dos estafilococos, modificando a bomba de efluxo dependente de ATP (PIEKARSKA-RADZIK *et al.*, 2022).

Segundo Zhang *et al.* (2023), a administração da classe de macrolídeos para animais produtores de alimento afim de crescimento, mesmo em concentrações muito baixas, podem originar resistência antimicrobiana, o que pode explicar a resistência apresentada em 100% dos nossos isolados. Outros dados na literatura (RAPINI *et al.*, 2003), inferem que quando analisado o perfil de sensibilidade dos isolados de leite cru, 100% dos isolados apresentaram resistência a eritromicina, o que corrobora para este presente trabalho.

A exposição de antibióticos frente aos animais é de extrema preocupação e foi relatada em estudos por Kenyon (2021), onde em um estudo ecológico, o autor observou uma associação positiva dos países que incluíam quinolonas na alimentação dos animais e o aumento da prevalência de bactérias resistentes ao mesmo grupo de fármacos.

Quando observado o perfil dos vinte e nove isolados de *S. aureus* oriundos dos queijos coalho frente ao antibiótico gentamicina, observa-se que todos (n=29) apresentaram sensibilidade ao fármaco. A gentamicina, pertencente a família dos aminoglicosídeos, foi introduzida na década de 1970 e é conhecida por inibir a função

dos ribossomos bacterianos, bloqueando a síntese de proteínas, resultando na morte bacteriana (LIU *et al.*, 2020), sendo que tal capacidade pode justificar a sensibilidade frente aos isolados testados (100%). A sensibilidade da gentamicina frente aos isolados de *S. aureus* obtidos do leite e queijo coalho também foi realizada por Pereira *et al.* (2018), onde dentre os 35 isolados de leite e 69 isolados do queijo, apenas uma amostra apresentou resistência a gentamicina.

O antibiótico vancomicina também foi avaliado no presente trabalho, observando-se o perfil de sensibilidade dentre todos isolados testados (29/29). A vancomicina é um antibiótico pertence a classe dos glicopeptídeos e atua contra bactérias Gram-positivas inibindo a síntese da parede celular (BHATTACHARYYA *et al.*, 2016). O uso da vancomicina foi realizado com sucesso para as cepas consideradas MRSA até o final da década de 90, sendo relatado a primeira “falha” deste antibiótico frente ao microrganismo. Entretanto, tal resistência não foi observada neste estudo, o que difere de dados reportados por alguns autores. Bomfim e colaboradores (2020), em estudos com queijo coalho, observaram que 52,9% das amostras analisadas, apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, sendo a maior prevalência a oxacilina e gentamicina, e posteriormente a eritromicina. Segundo Rapini *et al.* (2004), dos 22 isolados de *S. aureus* em queijos coalho comercializados em praias nordestinas, 90,9% apresentaram resistência a gentamicina, seguido por eritromicina e tetraciclina (86,4%), e oxacilina (81,8%).

Embora o perfil de resistência e sensibilidade dos antibióticos eritromicina, gentamicina e vancomicina apresentados estejam em divergência com a literatura, se faz necessário a análise molecular afim de averiguar a presença de genes específicos de resistência a estes antimicrobianos. Contudo, a prevalência dos antimicrobianos β -lactâmicos tais como penicilina, oxacilina, ampicilina e meticilina, aumentou nos últimos anos em todo o mundo (AREFI *et al.*, 2014), e esta preocupação foi avaliada e documentada no presente estudo.

Aproximadamente 700.000 pessoas morrem por ano devido a infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Resíduos de antibióticos em alimentos e animais aumentaram devido ao seu uso excessivo e algumas vezes desnecessário, e este fato é apontado como responsável pelo surgimento de cepas multidroga resistentes (KIM, AHN, 2022). Outro fato a ser levantando é a correlação da resistência antimicrobiana e o uso de sanitizantes. De acordo com Zmantar *et al.* (2011), a resistência a múltiplas drogas vem sido associado ao uso de anti-sépticos e

detergentes a base de amônia, sendo que algumas bactérias que abrigam o gene *qacA/B*, apresenta resistência a penicilina, o que se faz de extrema importância a realização de estudos relacionando a distribuição dos genes de resistência e a suscetibilidade a antissépticos.

Ao observar a resposta fenotípica dos isolados frente aos antibióticos β -lactâmicos, podemos observar que apenas os isolados de *S. aureus* do queijo coalho proveniente da amostra B (n=13), foram resistentes a oxacilina e cefoxitina, sendo que as demais marcas industriais e amostras artesanais apresentaram sensibilidade frente aos antibióticos a esta classe.

Observou-se neste experimento que todos os isolados apresentaram resistência à eritromicina, e 44,8% apresentaram resistência à cefoxitina e oxacilina. Esta situação requer muita atenção, uma vez que esses antibióticos são amplamente utilizados em rotinas clínicas. É extremamente importante estudar a transferência de resistência microbiana, uma vez que esta pode ocorrer em alimentos através de resíduos de antibióticos, transferência de patógenos, ou através da ingestão de alimentos contaminados por cepas resistentes (HENNEKINEE *et al.*, 2012).

Estudos de Kayili e Sanlibaba (2020), analisando queijos tradicionais da região da Turquia, inferem que dentre os 85 isolados de *S. aureus*, 60 (84,71%) apresentaram resistência aos β -lactâmicos, como penicilina, ampicilina e oxacilina, corroborando para nossos achados.

Outros achados acerca da resistência de cefoxitina e oxacilina em queijos coalho também estão descritos na literatura. De acordo com Santos (2013), analisando seis amostras de queijo coalho (sendo três com leite pasteurizado e outros três com leite cru), obtiveram 48 isolados de *S. aureus* (sendo 15 isolados para o queijo pasteurizado e 33 para queijo não pasteurizado), dos quais todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina, gentamicina e amicacina, 50% apresentaram resistência frente a penicilina e 10,42% apresentaram resistência a cefotixina (oriundos dos queijos elaborados com leite cru).

Resultados de Aragão *et al.* (2022), também condizem com o presente resultado. A presença de microrganismos patogênicos em superfícies de preparo de queijo coalho, materiais de ordenha e manipuladores de alimentos em onze fazendas leiteiras no estado de Pernambuco. Em seus resultados, os autores apontaram a prevalência de *Estafilococos* coagulase positiva em 62,20% das amostras analisadas,

sendo que 46,37% apresentaram resistência a penicilina e 10,14% para cefotixina e oxacilina.

Estudos recentes revelam a presença de isolados resistentes a muitos antimicrobianos em cadeias leiteiras, enfatizando a importância de boas práticas de higiene ao leite e seus derivados, para garantir a qualidade microbiológico do leite, queijo e outros produtos lácteos (ZEINHOM e ABED, 2021).

A resistência apresentada frente a cefotixina e oxacilina dos isolados de *S. aureus* da marca industrial identificada como B, reflete uma grande preocupação, pois o MRSA, responsável por inúmeras infecções na comunidade (CA-MRSA), em ambiente hospitalar (HA-MRSA) e associado ao gado (LA-MRSA), apresenta resistência frente a oxacilina e outros antibióticos pertencentes a classe dos β -lactâmicos. Neste contexto, analisando apenas a resposta fenotípica, 44,8% dos isolados de marcas industriais e artesanais, se apresentam como fortes indicadores de MRSA.

Entretanto, a expressão fenotípica frente a oxacilina pode alterar dependendo das condições de crescimento submetidas ao *S. aureus*, como temperatura e osmolaridade do meio, interferindo na precisão dos métodos para detecção da resistência (FUDA *et al.*, 2005). Os resultados obtidos por meio de análises moleculares dão suporte a atividades epidemiológicas como vigilância e investigação de surtos de DTAs, e essas ferramentas proporcionam uma melhor compreensão da patogênese das doenças. Desta forma, a detecção molecular pelo gene *mecA* e *blaZ* é considerado o método de referência para determinar isolados resistentes aos β -lactâmicos.

5.2.4 Genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos

Para os todos os isolados (n=29) de *S. aureus* foi avaliado a presença do gene *mecA* e *blaZ*, conforme ilustrado na Figura 18, 19, 20 e 21.

Podemos observar que dentre todos os isolados avaliados (n=29), apenas 44,8% (13 isolados provenientes da marca industrial B) apresentaram o gene *mecA* e *blaZ*, conforme tamanho de amplicon esperado, demonstrando capacidade genotípica para conferência a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Vale ressaltar que estes achados corroboram para a análise fenotípica realizada, sendo demonstrado resistência aos antibióticos cefotixina e oxacilina.

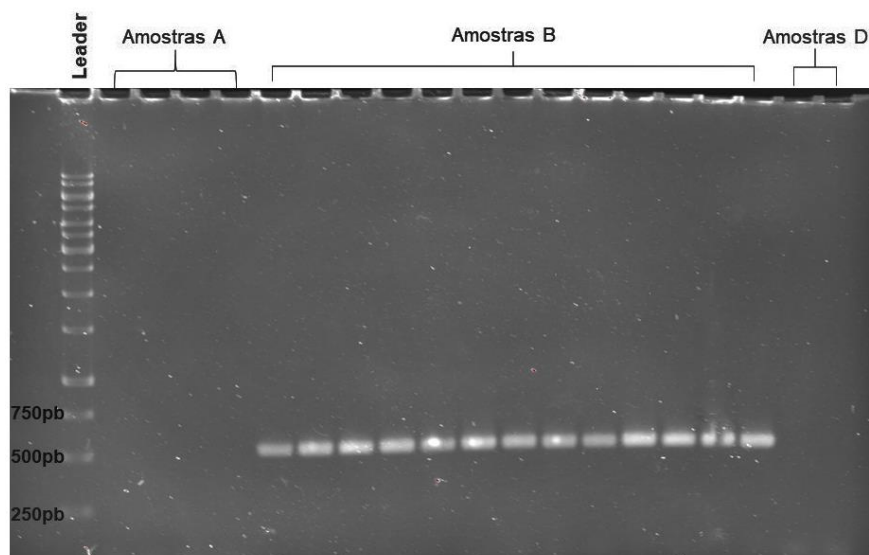


Figura 18. Detecção do gene *mecA* (amplicon 533pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

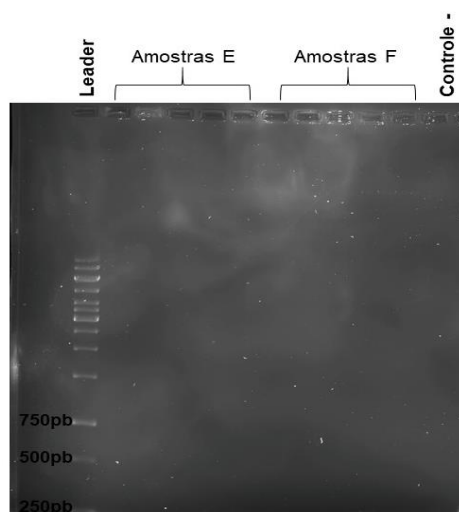


Figura 19. Detecção do gene *mecA* (amplicon 533pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

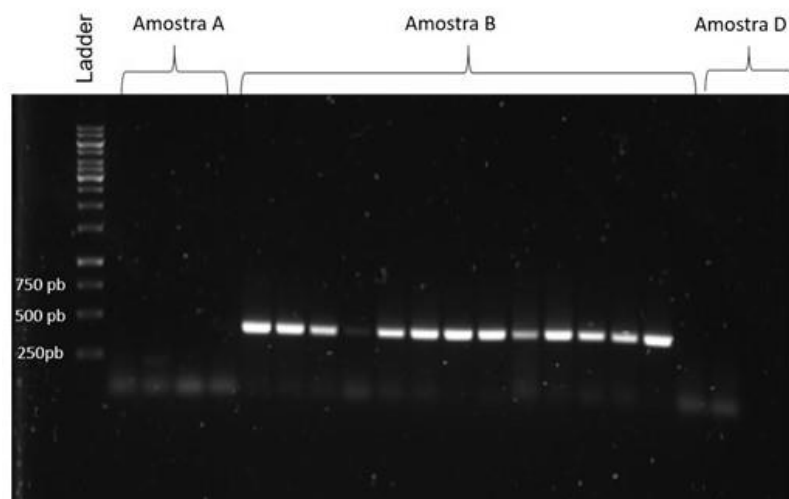


Figura 20. Detecção do gene *blaZ* (432pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

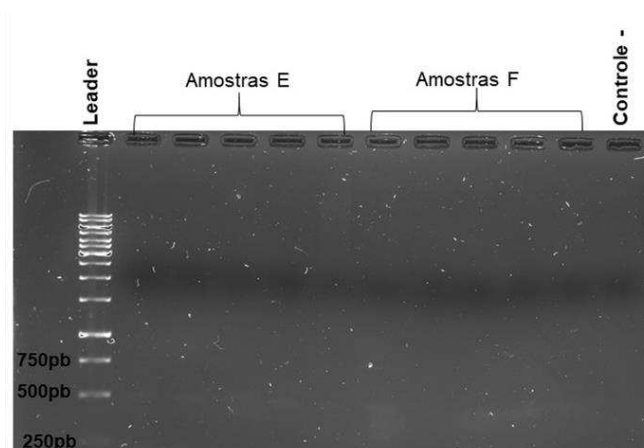


Figura 21. Detecção do gene *blaZ* (432pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

As cepas conhecidas como MRSA apresentam o gene *blaZ* e *mecA*, em DNA plasmidial e cromossômico, respectivamente, e são responsáveis pela resistência a antibióticos da classe β -lactâmicos (OKIKI *et al.*, 2020). A contaminação do queijo com *S. aureus*, portador do gene *mecA* e *blaZ*, é uma questão epidemiológica que se destaca porque o leite e seus derivados são fontes de disseminação do *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (PEXARA *et al.*, 2015).

Os MRSA são amplamente resistentes a diversas classes de antibióticos, e seus isolados em alimentos, apresentam capacidade de transferência de genes de

resistência para seus consumidores, tornando-o extremamente perigoso (JANS *et al.*, 2017). A presença de MRSA em fazendas produtoras de alimentos lácteos está diretamente relacionada a transferência dessas cepas entre humanos e animais. Outro fator importante é o compartilhamento de espaços em ambientes de criação, onde o surgimento de linhagens MRSA entre suínos, caprinos e ovinos, está se tornando cada vez mais comum (PEXARA *et al.*, 2015).

Relatos na literatura inferem que o tipo de elemento genético do SCCmec encontrados nos isolados dá origem ao tipo de resistência microbiana apresentada, sendo que os tipos I, IV, V, VI e VII favorecem a resistência apenas aos antibióticos β -lactâmicos, enquanto os tipos II e III são característicos de cepas multirresistentes (AGUIAR *et al.*, 2020), entretanto, não foi possível realizar tal observação no presente estudo.

Pesquisa realizada nos estados nordestinos de Pernambuco e Bahia, avaliou-se a qualidade microbiológica de 70 amostras de leite de cabra cru e 70 amostras de queijo coalho artesanal. Nos resultados, os autores apontam que dentre as 140 amostras, todos os isolados apresentaram o gene *mecA* e o gene *blaZ* (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Aragão e colaboradores (2019), avaliando a qualidade microbiológica de queijos coalho artesanal produzidos por leite de cabra na região do Nordeste, destaca que apenas 15,8% (27/171) apresentaram resistência fenotípica a oxacilina, entretanto, o gene *mecA* não foi detectado em nenhum dos isolados. O mesmo foi observado por França *et al.* (2012) e Peixoto *et al.* (2013) que analisando fenotipicamente os isolados de *S. aureus*, observaram que alguns isolados apresentavam resistência aos β -lactâmicos, porém, o gene *mecA* não foi detectado. Entretanto, o gene *blaZ* estava presente dentre as amostras resistentes a oxacilina.

Apesar da disseminação de bactérias resistente ser uma realidade, nota-se que o percentual de MRSA em leite e produtos lácteos difere conforme o local e região, fato este que pode ser explicado pelas diferenças ambientais, climáticas e até hábitos humanos (CUONG *et al.*, 2018).

Vários mecanismos estão envolvidos na resistência aos β -lactâmicos, como a produção de penicilinasas ou a alteração da proteína-alvo. No presente estudo, a triagem para a presença de *mecA* e *blaZ* entre os isolados de *S. aureus* mostrou uma alta prevalência desses genes, sugerindo que esses microrganismos no queijo coalho podem apresentar parede celular alterada ou possuir a capacidade de produção de β -

lactamases. Contudo, o fato de não detectar os genes *mecA* e *blaZ* nos isolados provenientes dos queijos artesanais elaborados com leite cru (amostra E) e leite termizado (amostra F) neste presente trabalho, pode estar associado à saúde do rebanho leiteiro e das boas práticas de manipulação do produtor.

5.2.5 Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

A intoxicação alimentar por estafilococos devido à ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns no mundo, entretanto, sua incidência ainda não é totalmente conhecida por se tratar de uma doença autolimitada, com duração de aproximadamente 24 a 48 horas, o que dificulta sua notificação (VITALE *et al.*, 2015).

As SEs são divididas conforme a função que apresentam, podendo ser classificada como toxina gastrointestinal, responsáveis por estimular o efeito emético do Sistema Nervoso Central e receptores neurais do intestino (desencadeando vômito, diarreia e fortes dores abdominais), e classificadas como superantígenos, capaz de promover a proliferação de células T não específicas, sendo responsáveis pelos sinais clínicos observados nos quadros de septicemia e síndrome do choque tóxico (ACOSTA, 2018).

Algumas SEs são mais frequentes em alimentos, como *sea* e *sed*, sendo que a primeira é considerada a principal toxina relacionada a surtos de intoxicação alimentar, e a *sed*, é considerada a segunda toxina mais comum e virulenta, sendo que baixas quantidades podem causar intoxicação alimentar (SCHELIN, 2010). Pela alta prevalência nos alimentos, se justifica a escolha destes genes para esta etapa do trabalho.

A pesquisa dos genes *sea* e *sed* nos isolados de queijo coalho de marcas industriais e amostras artesanais estão representadas na Figura 22, 23, 24 e 25. De acordo com os resultados obtidos, nenhum dos 29 isolados foi positivo para os genes avaliados codificadores de enterotoxina (*sea* e *sed*), já que os amplicons nos tamanhos esperados não foram encontrados, o que corrobora parcialmente com Pereira *et al.* (2018), que ao analisar amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijo pasteurizado, não observaram cepas positivas para o gene *sea* e *sed*, no entanto, as amostras positivaram para o gene *sec*.

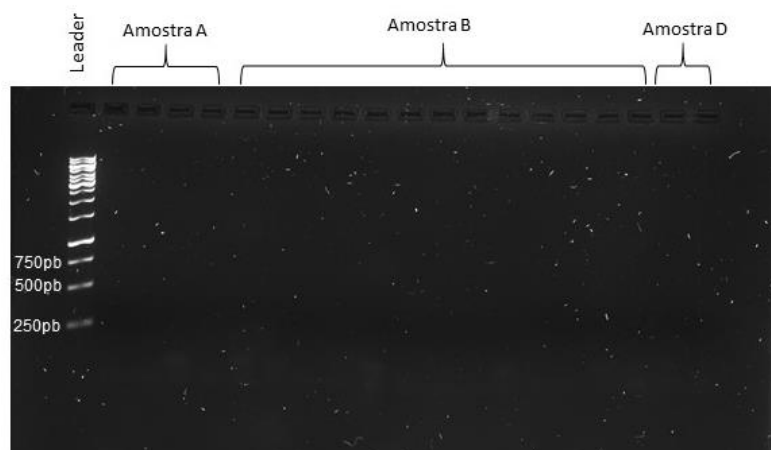


Figura 22. Detecção do gene *sea* (amplicon 127pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

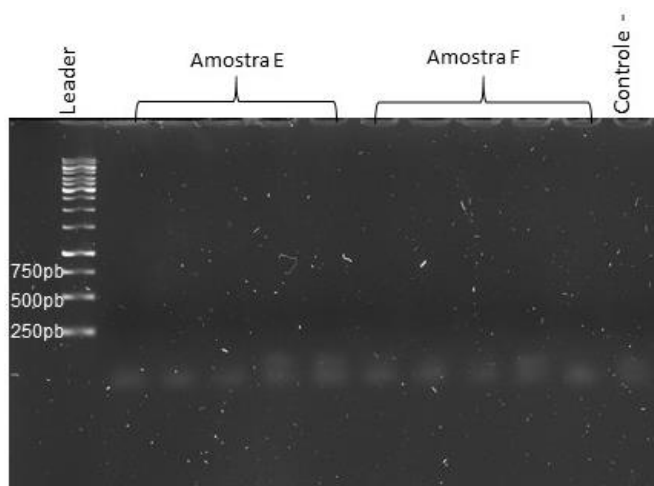


Figura 23. Detecção do gene *sea* (amplicon 127pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais (Amostras E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

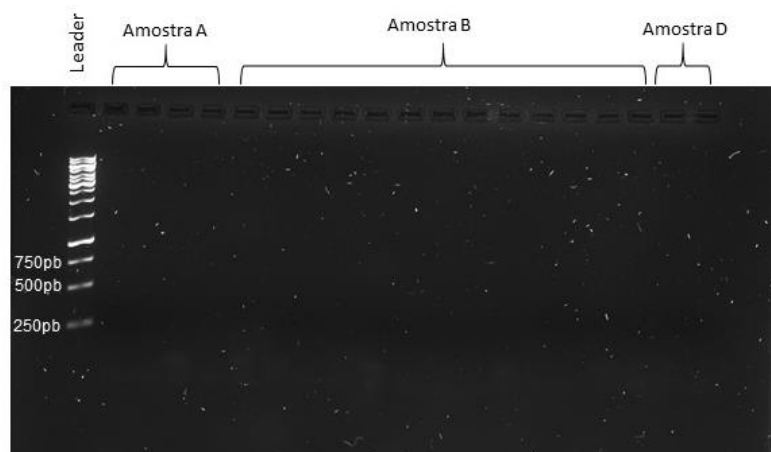


Figura 24. Detecção do gene *sed* (amplicon 317pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos industriais (Amostras A, B e D). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

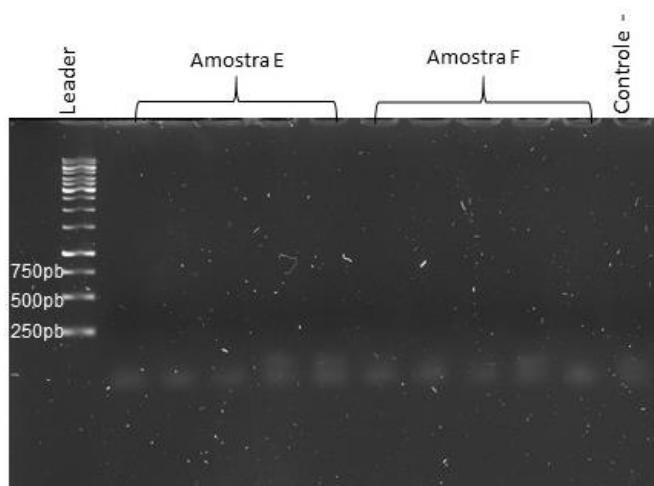


Figura 25. Detecção do gene *sed* (amplicon 317pb) para os isolados de *S. aureus* dos queijos artesanais (E e F). Após PCR, eletroforese em gel de agarose 1,5 % foi realizada para separação das bandas.

A detecção do gene *sea*, composto por 771 nucleotídeos, pode ser feita na metade da fase exponencial do crescimento de estafilococos, sendo que a quantidade de 100-200ng já é suficiente para a produção de sintomas. Já o gene *sed* está localizado no plasmídeo da penicilinase de 27,6kb e sua expressão acontece após a fase exponencial do crescimento (ACOSTA *et al.*, 2018), o que pode ser uma justificativa pelo qual não conseguimos observar a expressão dos genes avaliados.

Estudos de Ribeiro *et al.* (2020), avaliando a ocorrência do gênero *Staphylococcus* em fazendas leiteiras produtoras de queijos não pasteurizado no

estado de São Paulo, observaram que de 16 isolados de *Staphylococcus* ssp. resistentes a meticilina, nenhum apresentou o gene codificador de enterotoxina, fato este que corrobora para os achados deste trabalho. O mesmo pode ser observado em relatos de Hegab *et al.* (2020), que avaliaram os isolados de *S. aureus* em queijos tradicionais egípcios, e que dentre 40 isolados, nenhum apresentou o gene *sea*.

Entretanto, Castro e colaboradores (2020), avaliando a capacidade de formação de toxinas em isolados de queijos tipo Minas, comercializado no estado de Minas Gerais, relatam que dos 68 isolados, apenas 26 apresentaram algum gene codificador da toxina estafilocócica. Os genes encontrados com maior frequência foram *sea* e TSST-1 (14 isolados), enquanto o gene *sed* apresentou em apenas 2 isolados (2,63%).

De acordo com o Rall *et al.* (2014), avaliando a qualidade microbiológica de leite de vaca, apontaram que dentre os quinze isolados de *S. aureus*, oito apresentaram o gene *sea*, o que difere deste trabalho. Outro trabalho descreve que foram encontrados os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em queijarias do estado de São Paulo na produção de queijo minas frescal (MEDEIROS *et al.*, 2013).

Mesmo com os resultados negativos para os genes *sea* e *sed* não é possível afirmar categoricamente que as cepas não sejam produtoras de toxinas estafilocócicas, nem que o alimento não é capaz de ser veículo de intoxicação alimentar, pois há outros genes relacionadas a tal capacidade.

A combinação das enterotoxinas não clássicas como os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo* também são capazes de desencadear intoxicação estafilocócica, como foi observado por Johler *et al.* (2015), que ao investigar a causa de um surto na Suíça pela ingestão de queijo de cabra cru, observou que nenhum dos isolados de *S. aureus* apresentaram os genes de enterotoxina clássica (*sea* – *see*). O mesmo foi observado por Umeda e colaboradores (2017) que ao investigar o surto envolvendo alimentos servidos em almoço, observaram a presença apenas dos genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *sel*.

Segundo estudos, são necessárias cinco condições ideais para promover surtos de intoxicação alimentar: matérias-primas ou manipuladores portadores de cepas de *S. aureus* produtoras de SE; transferência de microrganismos de alimentos para equipamentos ou superfície através de má manipulação; alimentos com características favoráveis para multiplicação microbiana e produção de enterotoxinas; tempo e temperatura suficientes para o crescimento microbiano; e ingestão de toxinas

em alimentos (HENNEKINNE *et al.*, 2012). Além do mais, a produção de enterotoxinas pode ser influenciada por uma combinação de fatores, como umidade, atividade água, acidez e temperatura de armazenamento (BELLIO *et al.*, 2019).

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que essas condições favoráveis não foram encontradas durante o processo de manufatura dos queijos industriais e queijos artesanais, corroborando para a inocuidade da saúde do consumidor frente aos riscos que as SEs apresentam.

5.2.6 Capacidade de formação de biofilme *in vitro*

Neste presente trabalho, também foi avaliado a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de *S. aureus* proveniente das amostras de queijos. Esta capacidade em desenvolver o biofilme é considerada um fator de virulência do microrganismo, pois confere proteção à bactéria em ambientes diversos, assim como em indústrias, que pode consequentemente aumentar o risco de contaminação cruzada além de gerar perda econômica (VAZQUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013).

A habilidade de adesão celular e formação de biofilme facilita a troca de genes de resistência antimicrobiana entre bactérias, diminuem a permeabilidade a drogas, criam barreiras e, assim, contribuem para o surgimento de novas cepas de MRSA (SOHAIL, LATIF, 2018). Microrganismos que apresentam capacidade de adesão e crescimento celular, podem utilizar de diferentes materiais e superfícies como aço inoxidável, vidro, borracha e polipropileno para a formação do biofilme (MURGA *et al.*, 2001).

Embora esse teste qualitativo não seja o mais sensível para determinar a capacidade de formação de biofilme, ele foi utilizado como triagem para classificar os isolados quanto a capacidade de produção de biofilme, sendo ela alta, média ou baixa capacidade. Como pode ser observado na Figura 21, todas as barras (representando os isolados) que ultrapassam a linha traçada, apresentam alguma capacidade de formação de biofilme. Por outro lado, as barras que ficam abaixo da linha, não apresentam tal capacidade.

Dentre os 29 isolados, apenas 20,7% (6 isolados) não apresentaram capacidade de formação de biofilme nesta análise. Todos os isolados da amostra B (amostra industrial), amostra E e amostra F (amostras artesanais) apresentaram uma fraca capacidade para a produção, totalizando 79,3% (23/29).

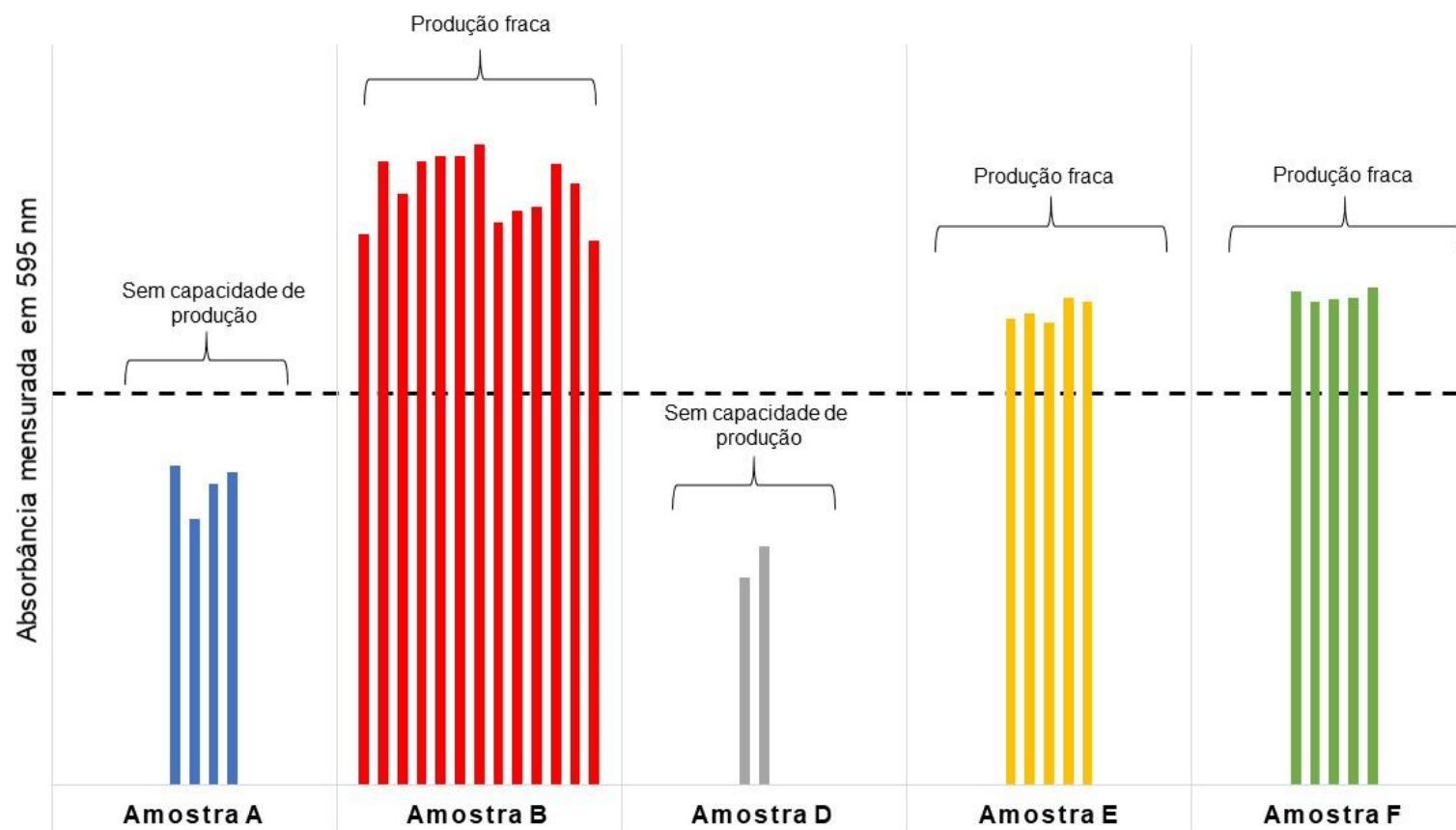


Figura 26. Capacidade de produção de biofilme – teste in vitro, dos isolados de *S. aureus* de queijos industriais e artesanais
A linha horizontal traçada (-----) representa a média da absorbância do controle negativo (ATCC 12228).

De acordo com Ballah *et al.* (2022), a interação entre os sistemas regulatórios e a expressão dos genes de adesão para a formação do biofilme, dependem da temperatura de superfície de contato, osmolaridade e concentração de glicose no meio utilizado. A adição de glicose 1% no meio TSB pode aumentar a ocorrência de formação de biofilme em isolados de *S. aureus* em até 83%, segundo o estudo de Rohde *et al.* (2001). Contudo, a adição da glicose neste presente trabalho foi de 5%, favorecendo a resposta de formação de biofilme, conforme apresentado pelos resultados.

Chen *et al.* (2020), avaliando isolados de *S. aureus* de diversos tipos de alimentos, enfatizam que apenas 3 isolados foram classificados como fortemente produtor de biofilme, e que a classificação de fraca produção foi de 54,64%, corroborando em partes para o presente estudo.

Em pesquisa com os isolados de queijo de leite de ovelha, Lauková *et al.* (2020), descrevem que de 17 cepas isoladas de *S. aureus*, 12 apresentavam capacidade fraca de formação de biofilme, enquanto apenas 5, não obtiveram a capacidade de formação de biofilme, fato este observado neste trabalho.

Bravo e colaboradores (2019), ao avaliar genotipicamente os isolados de *S. aureus* de leites e queijos provenientes de fazendas do estado de São Paulo, observaram que a maioria das cepas apresentaram um ou mais genes que codificam a aderência ao biofilme, entretanto, quando avaliado o teste *in vitro*, notou-se que a incubação após 12 horas não foi capaz que promover a formação de biofilme, porém, quando observada a incubação por 96h, foi possível identificar a aderência em alguns isolados. Este fato, vem de encontro com o descrito na literatura, que a observação da expressão fenotípica em testes *in vitro* são dependentes de alguns fatores externos.

Pesquisa rastreando 420 amostras entre swabs de mãos de manipuladores e alimentos como carne, leite, queijo, ovo, peixe e fast food, observaram que pelo método quantitativo, 20% dos isolados de *S. aureus* foram considerados fortes frente a capacidade de formação de biofilme, 77% considerados intermediários e 3% não apresentavam a capacidade (BALLAH *et al.*, 2022).

Estudos de Atshan *et al.* (2012), apontam que os isolados de *S. aureus* e MRSA produtores de biofilme avaliados em seu trabalho, apresentavam a proteína de ligação à elastina, conhecida como *ebps* a qual favorece a aderência do microrganismo. Segundo Falaki e Mahdavi (2017) a primeira fase de adesão das

células microbianas em superfície para a formação do biofilme, é mediada pela PIA (Polissacarídeo Intercelular de Adesão), cuja síntese é desencadeada pela presença de proteínas de adesão intercelular, como *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, além dos genes como *fnbA*, *fnbB* e *clfB*, que desempenham papel fundamental para a adesão bacteriana.

Nesta etapa do trabalho, não foi realizado a pesquisa de genes envolvidos na formação de biofilmes, contudo frente aos relatos na literatura, é de extrema importância a avaliação genotípica afim de averiguar os genes envolvidos e a capacidade de expressão dos genes envolvidos.

5.2.7 Análise quantitativa de bactérias totais

Outro ponto avaliado no presente trabalho, foi o estudo da importância do tratamento térmico do leite empregado na produção de queijo coalho. Para essa etapa, foi realizado a análise comparativa e quantitativa de bactérias totais do queijo coalho industrial (comercializado nas redes de supermercado) e do queijo coalho artesanal (elaborado com leite cru e leite termizado, apenas para fins comparativos) utilizando PCR quantitativo. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

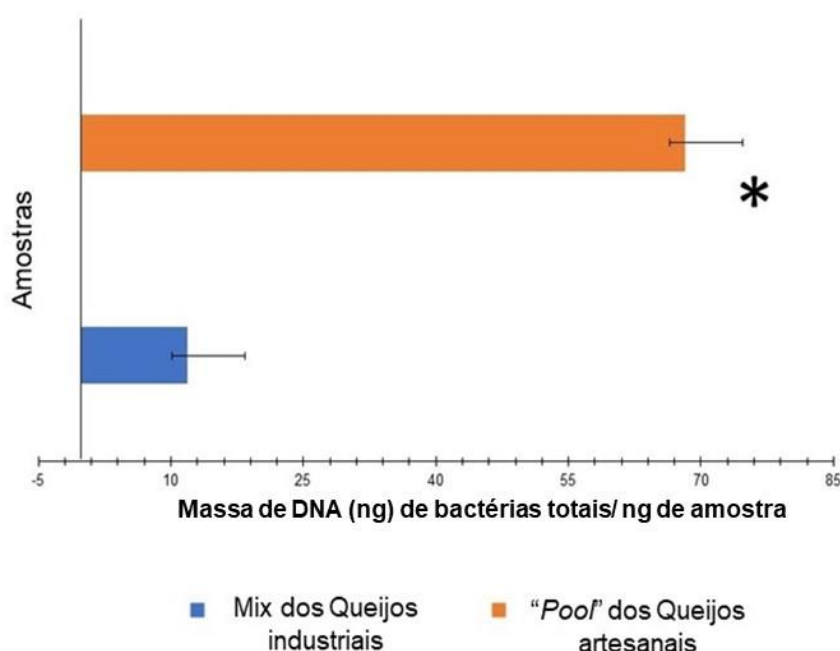


Figura 27. Quantificação de DNA das bactérias totais em amostras de queijo. PCR em tempo real foi realizada com DNA extraído das amostras. *demonstra diferença significativa $p < 0,05$ utilizando teste ANOVA.

Podemos observar que quando quantificado o DNA das bactérias totais/ng das amostras, os queijos artesanais apresentam maior concentração quando comparado aos queijos industriais. A média da concentração de DNA de bactérias totais em queijos artesanais, foi de aproximadamente 68ng/ng de amostra (sendo 69,3ng/ng para a amostra E, e 66,9ng/ng para a amostra F), enquanto que a amostra de queijo industrial foi 11,7ng/ng, demonstrando diferença significativa entre as amostras comerciais e artesanais.

Tais concentrações de DNA bacteriano estão relacionadas a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) e/ou de microrganismos patogênicos e deteriorantes. As BAL estão presentes naturalmente no leite cru e podem ser adicionadas intencionalmente como culturas iniciadoras na produção de queijo, conforme demonstrado por vários autores (MORAES *et al.*, 2018, SANTOS *et al.*, 2014), afim de acentuar as propriedades sensoriais. Os gêneros que compreendem este grupo são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium*, entre outros (CARR *et al.*, 2002; YERLIKAYA, 2018).

A diferença da massa de DNA das bactérias totais dos queijos industriais e artesanais, se deve pela qualidade microbiológica da matéria prima, ou seja, do leite utilizado para a produção dos queijos. Por se tratar de um produto alimentício com selo de inspeção proveniente de um processamento industrial, espera-se que a saúde do rebanho leiteiro, além dos cuidados como armazenamento e transporte do leite empregado, esteja em condições ideais de salubridade, fato este que podemos observar quando quantificado as bactérias totais das amostras industriais (11,7ng/ng). Já para os queijos provenientes de produção artesanal, frente aos achados da quantificação de bactérias totais (68ng/ng), podemos inferir que a qualidade microbiológica do leite ordenhado e os cuidados de manejo do rebanho leiteiro estão insatisfatórios, devido a diferença significativa quando comparada ambas as amostras (industriais *versus* artesanais).

Outra diferença das amostras analisadas, é a presença ou não do tratamento térmico do leite empregado na produção de queijo. Todas as amostras comerciais (A a D) adquiridas nas redes de supermercados, utilizam leite pasteurizado para a fabricação do queijo, enquanto que as amostras artesanais

foram elaboradas através de leite cru e leite termizado (processo pelo qual não atingem o tempo e temperatura empregada no processo de pasteurização).

O tratamento térmico do leite altera vários fatores como o pH, consistência, acidez, matéria seca, microbiota entre outros. Para o processo de pasteurização pode ser adotado o processo lento, no qual consiste em empregar temperaturas de 62-65°C por 30 minutos, e o processo de curta duração, também conhecida por High Temperature Short Time (HTST), no qual a temperatura atinge 72-75°C por 15-20 segundos (TORREZAN *et al.*, 1998). Neste processo térmico, a intenção é a destruição da carga microbiana patogênica e deteriorante, contudo a contaminação pode ocorrer também pós pasteurização (MARTINS, 2022).

Já o processo de termização é considerado o tratamento térmico utilizando temperatura de 64°C de 5-20 segundos, e tem por objetivo a eliminação da grande maioria de microrganismos psicotróficos, aeróbias mesófilas e prevenção da ação enzimática no processo de refrigeração (TORREZAN *et al.*, 1998).

Contudo, não podemos inferir que a redução da carga microbiana quando comparada as amostras industriais e artesanais se deva pelo processamento térmico do leite utilizado, uma vez que a técnica de PCR quantitativo é feita à partir do DNA microbiano, não permitindo concluir diretamente se os organismos identificados estavam viáveis no produto no momento da análise.

A presença das BAL nos alimentos é de extrema importância em duas principais vias, sendo a primeira, na degradação de carboidratos e conseqüentemente, na redução do pH, contribuindo para o aumento da vida útil do produto, e no processo de biopreservação de alimentos frente a outras bactérias patogênicas e deteriorantes, pela capacidade de produção de agentes antimicrobianos, ácidos orgânicos, bacteriocinas, entre outros (MADERA *et al.*, 2003, CHEN; HOOVER, 2003).

De acordo com Machado *et al.* (2011), o queijo é um dos alimentos no qual a presença de BAL é a de maior predominância, e a presença de *S. aureus* é fortemente encontrada como microrganismo patogênico. Estudos de Caridi (2003) revelaram a utilização das bactérias ácidos lácticas, isolados a partir de queijos e leite, na conservação de outros alimentos e no controle de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus* spp e encontraram resultados positivos frente a biopreservação.

Os achados dessa análise nos permitem inferir que o processo térmico eficaz, como o da pasteurização, reduz a carga microbiana do alimento, conferindo maior segurança aos consumidores. Contudo, apenas com os resultados obtidos para esta etapa, uma vez que foi quantificado a concentração do material genético de bactérias totais presentes nas amostras, não é possível afirmar que a concentração bacteriana encontrada nos queijos artesanais, seja somente pela presença de bactérias patogênicas e deteriorantes, já que a presença de BAL é fortemente observada neste grupo de derivado lácteo.

5.3 Conclusão

Frente ao apresentado, pode-se concluir que os isolados de MRSA foram provenientes apenas de uma marca industrial analisada, o que nos faz questionar sobre a qualidade e saúde do rebanho leiteiro do qual este produto foi obtido, já que a presença de cepas resistentes pode ser oriunda da grande exposição aos antibióticos. Além disso, os mesmos isolados (amostra B) apresentaram fraca capacidade de formação de biofilme, assim como os isolados das amostras artesanais (E e F), demonstrando outro fator de virulência associado ao microrganismo, comprometendo a produção queijeira, uma vez que a formação de biofilme dentro da cadeia produtiva pode levar a grandes perdas econômicas, comprometer a qualidade dos produtos e desencadear um problema de saúde pública.

Por outro lado, através da análise quantitativa em qPCR, podemos observar que as amostras comerciais apresentam carga microbiana significativamente menor quando comparado as amostras artesanais, contudo, através dessa análise, não podemos afirmar que a menor carga microbiana observada seja destinada apenas ao grupo de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, fazendo-se necessária a quantificação através de qPCR utilizando iniciadores específicos para um resultado preciso.

6. DISCUSSÃO GERAL – CAPÍTULO I e CAPÍTULO II

A qualidade microbiológica de queijos e produtos lácteos é de extrema importância uma vez que estes alimentos, pelas suas características nutricionais, podem vir a abrigar microrganismos deteriorantes e patogênicos, assim como *S. aureus*, responsável por inúmeros surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo.

O manejo do gado leiteiro, a qualidade microbiológica do leite utilizado, o emprego do tratamento térmico e a saúde do rebanho leiteiro, reflete de forma direta e incisiva a presença de *S. aureus*. Afim de promover a saúde e ganho de peso dos rebanhos, o uso de antibióticos passou a ser utilizado de forma indiscriminada, o que favorece o surgimento de novas cepas resistentes a estes fármacos, denominados MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina).

Frente aos resultados observados no Capítulo I e II desta presente tese, podemos observar que o tratamento térmico do leite a ser utilizado para a produção do queijo coalho, é de extrema importância para a qualidade microbiológica do produto final, uma vez que as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*, dos queijos comerciais (elaborados a partir de leite pasteurizado), se mantiveram de acordo com a legislação vigente e foi observada ausência de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* (IN nº161 e RDC nº 12). Entretanto, observa-se que quando avaliado a qualidade microbiológica do queijo elaborado com leite cru e leite termizado (para fins comparativos), embora também não se tenha observado a presença de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, as contagens obtidas de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva ultrapassam o permitido.

Foi observada menor carga microbiana dos queijos de coalho comerciais quando comparado aos queijos artesanais utilizando-se a técnica que qPCR. Contudo a referida técnica não avalia a viabilidade dos microrganismos presentes. Empregando-se métodos convencionais em contagens em placas foi observado menor contagens de *Staphylococcus* e *E. coli* quando comparado o queijo industrial frente ao artesanal.

Observou-se a concentração de 11,7ng DNA/ng de bactérias totais para as amostras de queijo coalho comerciais. Essa concentração pode estar relacionada com a presença de DNA bacteriano de possíveis bactérias patogênicas e deteriorantes que foram inativadas pelo tratamento térmico, e também de bactérias

ácido láctico presente no alimento, adicionado de forma intencional na indústria, podendo apresentar a capacidade bioprotetora frente a bactérias patogênicas.

A comercialização de queijos elaborados por leite cru nos estados de São Paulo e Minas Gerais deixou de ser permitida, porém, ainda é possível observar sua comercialização em pequenas queijarias de forma clandestina, pois as propriedades sensoriais ainda são muito apreciadas por alguns consumidores.

Quando avaliado a presença de *S. aureus*, de acordo com estudos, a carga celular deste microrganismo necessária para a produção de SEs tem de ser superior a 10^5 UFC /g, contagem esta não obtida nas amostras de queijos coalho industrial, contudo, a amostra artesanal elaborada com leite cru, obteve contagem de $2,1 \times 10^5$ UFC/g.

Embora as contagens obtidas para *S. aureus* das amostras comerciais e a partir de leite termizado estejam em conformidade com a normativa IN nº161 (Vide Capítulo 1), este microrganismo pode produzir diversos fatores de virulência responsável pela invasão celular e redução das células do sistema imunológico. Desta maneira, foi investigado a capacidade de produção de enterotoxinas, avaliando o gene *sea* e *sed*, além de realizar a pesquisa fenotípica e genotípica dos isolados de *S. aureus* frente a antibióticos e genes de resistência, além de avaliar a capacidade de formação de biofilme.

Não foi possível observar a expressão dos genes *sea* e *sed*, entretanto, não se pode descartar a possibilidade dos isolados, obtidos neste trabalho, em representarem risco de proporcionar intoxicações alimentares, uma vez que existem outros genes conhecidos na literatura por tal capacidade, não avaliados na presente pesquisa. Em relação ao perfil de susceptibilidade microbiana, um fato interessante que pode ser observado é que apenas os isolados da amostra industrial B apresentou resistência frente aos antibióticos oxacilina e cefoxitina (teste fenotípico) e apresentou os genes *blaZ* e *mecA*, responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sendo um forte indicativo do uso indiscriminado destes fármacos utilizados em rebanhos leiteiros.

Ainda que o queijo coalho industrial B tenha atendido à legislação, a presença de isolados de *S. aureus* com capacidade de resistir a ação dos antibióticos testados e a presença de genes de resistência, é de grande preocupação. Outro ponto de extrema relevância é que estes mesmos isolados, oriundos da amostra B, e isolados das amostras de queijos E e F, apresentam uma

fraca capacidade de formação de biofilme, agravando a patogênese destas bactérias. A capacidade de adesão celular em superfície e presença de genes de resistência à antimicrobianos, faz dos isolados da amostra B uma ameaça potencial para saúde pública, pois conforme descrito anteriormente, a formação do biofilme proporciona a troca de genes de resistência entre uma espécie e outra, resistência horizontal e o surgimento de outras cepas multiresistentes em ambientes comunitários.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente os resultados obtidos no Capítulo I e Capítulo II desta presente tese, podemos inferir que a qualidade microbiológica das marcas industriais analisadas apresentam-se em conformidade com a legislação vigente frente a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e pela ausência de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, podendo ser classificados como adequados para o consumo e comercialização.

Entretanto, ainda que as contagens não ultrapassem o estipulado pela legislação, a presença de isolados de *S. aureus* que carregam genes de resistência frente a classe de antibióticos mais utilizados na rotina clínica e de apresentar capacidade de formação de biofilme, é de grande preocupação em âmbito industrial, comunitário e hospitalar.

Desta forma, se faz necessário a realização de mais pesquisas de forma contínua dos microrganismos patogênicos em alimentos, bem como à nível molecular afim de avaliar a capacidade de expressão dos fatores de virulência de *S. aureus* presentes, afim de reduzir riscos microbiológicos.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Evolução da produção mundial de leite**, 2017. Disponível em <http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=1796&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: fevereiro de 2021

ABREU, A.C.S. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo. **Journal of Dairy Science**. 104(4): 4012-4022, 2021.

ACOSTA, A.C. et al. *Staphylococcus aureus* virulence factors. **Medicina Veterinária**. 11(4): 252-269, 2017.

AGUIAR, F.R.M. Presença de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) em queijos de coalho produzidos no estado do Ceará e seu perfil de resistência e genes de virulência. Tese. Universidade Federal do Ceará. 2022. 149p.

AHMED, A.A.H. et al. Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. **Food Control**, 104, 20– 27, 2019.

ANDRADE, A. P. C. Diversity of *Staphylococcus* coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. 36(1): 1-9, 2019.

ARAGÃO, B. B. et al. Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Microbiology and Infectious Diseases**. 84, 2022.

ARAGÃO, B. B. et al. Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science** .102(8): 1-5, 2019.

ARAGÃO, B.B. et al. Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 84: 10178, 2022.

AREFI, S. A. et al. Isolation, Antimicrobial Susceptibility and *mecA* Gene Analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* in Iranian White Cheeses. **Iranian Journal of Veterinary Research**. 15(2): 127–131, 2014.

ATSHAN, S. S. et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**. 1-10, 2012.

BALLAH, F. M. et al. Phenotypic and Genotypic Detection of Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus* from Different Food Sources in Bangladesh. **Biology**. 11: 949, 2022.

- BARCUDI, E.J. *et al.* MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study **Journal of Infection**. 80, 24-37, 2020.
- BASANISI, M. *et al.* Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food Microbiology**. 62, 141– 146, 2017.
- BECKER, K. *et al.* Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**. 27: 870-926, 2014.
- BELLIO, A. *et al.* Insight into the distribution of staphylococci and their enterotoxins in cheeses under natural conditions. **Frontiers Microbiology**. 9: 1–8, 2019.
- BHATTACHARYYA, D. *et al.* First Report on Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bovine and Caprine Milk. **Microbial Drug Resistance**. 22(8): 2016.
- BOMFIM, A. P. Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos Coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**. 27: 1-10, 2020.
- BRAVO, M. M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. **Food Research International**. 122: 450-460, 2019.
- BROOKS, J. C. *et al.* Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**. 31:154–158, 2012.
- CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**. 13(3): 191-200, 2003.
- CARR, F. J. *et al.* The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. 28: 281-370, 2002.
- CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Food Science Food Safety**. 02(30): 82-100, 2003.
- CASTRO, R. D. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **Journal of Dairy Science**. 103(3): 2998-2110, 2020.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. *et al.* Molecular Analysis of Pathogenicity, Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) and Biofilm Genes of Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Ready-to-Eat Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 20(2): 1375, 2023.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. *et al.* Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus* spp. Harboring antibiotic resistance genes. **Journal Food Protection**. 77: 993–998, 2014.

CHEN, Q. *et al.* Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. **Microbiology Open**. 9(946)1-11, 2020.

CHENOUF, N. S. *et al.* Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and PVL/mecA genes in cefoxitin-susceptible *Staphylococcus aureus* (t044/ST80) from unpasteurized milk sold in stores in Djelfa, Algeria. **Journal of Dairy Science**. 104 (3): 2684-2692; 2021.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. [ISBN 1-56238-556-9] 19087-1898 USA, 2005.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. Tese. Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais. 2008, 123f.

CUONG, N. V. *et al.* Antimicrobial Usage in Animal Production: A Review of the Literature with a Focus on Low- and Middle-Income Countries. **Antibiotics**. 7(3), 2018.

DIAS, N. L. *et al.* Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 63(6): 1547-1552, 2011.

FALAKI, M. C. B.; MAHDAVI, S. Study of Distribution of Biofilm Producing Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Local Cheese Samples in Maragheh City. **Gene Cell Tissue**. 4(4): 1-5, 2017.

FERREIRA, A.M. *et al.* Correlation of phenotypic tests with the presence of the *blaZ* gene for detection of beta-lactamase. **Brazilian Journal Microbiology**. 48: 159-166; 2017.

FILIPELLO, V. *et al.* Molecular characterization and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates from the dairy production chain in Northern Italy. **International Dairy Journal**. 91, 110– 118, 2019.

FOUNOU, L. L. *et al.* Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. **Frontiers in Microbiology**. 7, 2016.

FRANÇA, C. A., *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32:747–753, 2012.

FUDA, C.C.S. *et al.* β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62, 2617, 2005.

HEGAB, O. W. *et al.* Isolation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harboring *seb* gene and enteropathogenic *Escherichia coli* (serogroups O18, O114, and O125) from soft and hard artisanal cheeses in Egypt. **Open Veterinary Journal**, 10(3): 297–307, 2020.

HENNEKINNE, J.A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol.** 36(4):815-836, 2012.

JANS, C. *et al.* East and west African milk products are reservoirs for human and livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, 65: 64–73. 2017.

JOHLER, S. *et al.* Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by *egc*-encoded enterotoxins. **Toxins**, 7:997-1004, 2015.

KAYILI, E.; SANLIBABA, P. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Turkey. **International Journal of food properties**. 23(1): 1441–1451, 2020.

KENYON, C. Positive Association between the Use of Quinolones in Food Animals and the Prevalence of Fluoroquinolone Resistance in *E. coli* and *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*: A Global Ecological Analysis. **Antibiotics**. 10(10): 2021.

KHUSRO, A., AARTI, C. Metabolic heterogeneity and techno-functional attributes of fermented foods-associated coagulase-negative staphylococci. **Food Microbiology**. 105: 104028, 2022.

KIM, J., AHN, J. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. **Food Science and Biotechnology**. 31: 1481-1499, 2022.

KRÜGER, H. Novel macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm* (54) in MRSA ST398 from Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 77(8): 2296-2298, 2022.

KWIECINSKI, J.M., HORSWILL, A. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion in Microbiology**. 53: 51-60, 2020.

LAUKOVÁ, A. *et al.* Susceptibility to Bacteriocins in Biofilm-Forming, Variable *Staphylococci* Isolated from Local Slovak Ewes' Milk Lump Cheeses. **Foods**. 9: 1-12, 2020.

LIU, S. *et al.* Synergistic antimicrobial effects of photodynamic antimicrobial chemotherapy and gentamicin on *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 30: 2020.

MACHADO, T. F. *et al.* Interferência da microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus coagulase positiva*. **Revista Ciência Agronômica**. 42(2): 337-341, 2011.

MADERA, C. *et al.* Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**. 86(3): 213-222, 2003.

MARTINS, A.F. **Identificação e avaliação de perdas no processamento de leite**. Dissertação. Universidade do Minho, 2022. 123p.

MATSUKI, T. *et al.* Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. **Applied and Environmental Microbiology**. 70(12): 7220–7228, 2004.

MEDEIROS, M.I.M. *et al.* Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo Minas Frescal. **Ciência Animal Brasileira**. 14: 98-105, 2013.

MELO, F. D. *et al.* Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates recovered from raw milk and artisanal cheese. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 92(3): 1-7, 2020.

MORAES, G.M.D. *et al.* Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes. **Food Science and Technology**. 94: 57-63, 2018.

MURGA, R. *et al.* Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. **Microbiology**. 147: 3121-3126, 2001.

NORMANNO, G. *et al.* Occurrence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in buffalo bulk tank milk and the farm workers in Italy. **Food Microbiology**. 91, 2020.

OKIKI, P.A. *et al.* Occurrence of *mecA* and *blaZ* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with vaginitis among pregnant women in Ado-Ekiti, Nigeria. *New Microbes New Infection*, 38: 100772; 2020.

OLIVEIRA, A. P. D. *et al.* Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. **International Journal of Dairy Technology**. 70: 1-12, 2019.

OLIVEIRA, A. P. D. *et al.* Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. **International Journal of Dairy Technology**. 70: 1-12, 2019.

PAPPA, E. C. *et al.* Microbiological and biochemical characteristics of Kashkaval cheese produced using pasteurised or raw milk. **International Dairy Journal**. 89: 60-67, 2018.

PATEL, M.D.M. *et al.* Antibiotic stewardship in food-producing animals: Challenges, progress, and opportunities. **Clinical Therapeutics**. 42(9): 1649– 1658, 2020.

PEIXOTO, R. M. *et al.* Genes de resistencia a antimicro-bianos e producao de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de caprinos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**. 20:343–344, 2013.

PELISSER, M. R. *et al.* Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:145-148, 2009.

PEREIRA, L.S. *et al.* Toxigenic *Staphylococcus aureus* in processing of coalho and mozzarella cheese. **African Journal of Microbiology Research**. 11(13): 521-529, 2017.

PEREIRA, C.T.M. *et al.* Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**. 39(5): 1957- 1968, 2018.

PEXARA A. *et al.* Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw ovine and caprine milk in Greece Andreana. **Dairy Science and Technology**. 96:345–357, 2015.

PIEKARSKA-RADZIK, L. *et al.* Analysis of phenotypic and genotypic antibiotic resistance of food isolates of *Staphylococcus* ssp. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**. 21(4): 411-428, 2022.

POSSEMIERS, S. *et al.* The Prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin in Vitro and in the Human Intestine. **Journal of Nutrition**. 136(7): 1862-1867, 2006.

RAINARD, P *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**. 65: 149-165, 2018.

RALL, V. L. M. *et al.* Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. 97: 829-837, 2014.

RAPINI, L. S. *et al.* Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Revista Higiene Alimentar**. 56. 130-136, 2004.

RAPINI, L. S. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 56(1):130-133, 2003.

RIBEIRO, L. F. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. on Brazilian Dairy Farms that Produce Unpasteurized Cheese. **Toxins**. 12(779): 1-10, 2020.

ROHDE, L. *et al.* Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype. **Journal of Clinical Microbiology**. 39: 4595-4596, 2001.

SANTOS, D.M. Susceptibility profile and antimicrobial multiresistance of *Staphylococcus aureus* strains from Brazilian “coalho” cheese. *Science within Food: Up-to-date*. **Advances on Research Educational Ideas**. 1: 239-242, 2013.

SANTOS, K.M.O.S. *et al.* Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, 2014.

SCHELIN J, *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**. 2(6): 580-592, 2011.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Metodologia de Análises Microbiológicas de Água e Alimentos**. 4ed. São Paulo. Livraria Varela, 2010a.

SOHAIL, M., LATIF, Z. Molecular analysis, biofilm formation, and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing community- and health care-associated infections in central venous catheters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 51(5): 603-609, 2018.

TADJINE, D. Milk heat treatment affects microbial characteristics of cows' and goats' “Jben” traditional fresh cheeses. **Food Science Technology**. 1-8, 2020.

TEIXEIRA, J. P. *et al.* Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 73(3): 272-279, 2014.

TITOUCHE, Y, *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. **Journal Dairy Science**. 102(8): 6876-84, 2019.

TORREZAN, R. Revisão: Influência do tratamento térmico do leite destinado à fabricação de queijo. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. 16(2): 149-170, 1998.

UMEDA, K. *et al.* Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *selu* genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**. 256: 30-35, 2017.

VAZQUEZ-SANCHEZ, D. *et al.* Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Current Microbiology**, 66: 110–121, 2013.

VIDOVIC, N., VIDOVIC, S. Antimicrobial resistance and food Animals: Influence of livestock environment on the Emergence and dissemination of antimicrobial resistance. **Antibiotics**, 9(2), 2020.

VITALE, M. *Staphylococcal* Food Poisoning Case and Molecular Analysis of Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Food in Sicily, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**. 21(1): 2015.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal Dairy Science**. 102(1): 124-134, 2018.

ZAYDA, M.G. *et al.* Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis and Egyptian raw milk cheese. **International Dairy Journal**. 104, 2020.

ZEINHOM, M. A.; ABED, A. H. Prevalence, characterization, and control of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and Egyptian soft cheese. **Journal of Veterinary Medical Research**. 2021.

ZHANG, F. *et al.* The emergence of novel macrolide resistance island in *Macroccoccus caseolyticus* and *Staphylococcus aureus* of food origin. **International Journal of Food Microbiology**. 386, 2023.

ZHOU, N. *et al.* Global antimicrobial resistance: a system-wide comprehensive investigation using the Global One Health Index. **Infectious Diseases of Poverty**. 11(92), 2022.

ZMANTAR, T. *et al.* Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**. 4:453, 2011.

9. ANEXO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AA0CB45

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AA0CB45**
 Usuário: **Nayara Kastem Scharlack**
 CPF/CNPJ: **390.516.028-55**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Staphylococcus aureus

Título da Atividade: **Avaliação da qualidade microbiológica de queijo coalho e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de Staphylococcus aureus resistentes a metilina**

Equipe

Nayara Kastem Scharlack **UNICAMP**
Adriane Elisabete Antunes de Moraes **Universidade de Campinas - Unicamp**

Parceiras Nacionais

46.068.425/0001-33 / Universidade Estadual de Campinas

Data do Cadastro: **30/11/2022 22:29:16**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:28 de 13/12/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**