



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

**BRUNA BARROS DA SILVA**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS**  
**INFORMAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

BRUNA BARROS DA SILVA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS  
INFORMAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do grau de Bacharel  
em Farmácia, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.



**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a)

BB894a BARROS DA SILVA, BRUNA  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS  
INFORMAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL / BRUNA  
BARROS DA SILVA; orientador DANIELA CASTILHO ORSI; co  
orientador IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA SILVA. -- Brasília,  
2019.  
54 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de  
Brasília, 2019.

1. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA . 2. QUEIJO MINAS FRESCAL. 3.  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA. 4.  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA. I. CASTILHO ORSI, DANIELA ,  
orient. II. CRISTINA RODRIGUES DA SILVA, IZABEL, co-orient.  
III. Título.

BRUNA BARROS DA SILVA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS  
INFORMAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Msc. Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Msc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Melque e Héliida e ao meu irmão Saimon que sempre me apoiaram e deram todos os recursos necessários para concluir o meu curso. Sou grata aos meus amigos sempre presentes na minha vida e por aguentarem meus momentos de estresse durante toda essa fase. Nesse período houve momentos difíceis, mas as lembranças que ficam são de aprendizado e amadurecimento.

Por fim, agradeço a professora e orientadora Dr. Daniela Orsi por ser muito prestativa durante toda a pesquisa e tornar esse percurso muito gratificante, e também aos demais professores da Faculdade de Ceilândia-UnB que auxiliaram em toda a construção do meu conhecimento.

## RESUMO

O queijo Minas frescal, por se tratar de um alimento altamente perecível, por sofrer muita manipulação e por apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos é um alvo importante de contaminação microbiológica. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas frescos de fabricação informal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal. Todas as amostras deste estudo (100%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que 6 amostras (85,7%) excederam o limite permitido para *S. aureus* (máximo permitido de 2,7 log UFC/g), 3 amostras (42,7%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes (máximo permitido de 2,7 log UFC/g) e 1 amostra teve a presença de *Salmonella* spp. (14,3%). As bactérias *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram confirmadas nas amostras de queijos através da detecção dos genes *Nuc* e *InvA*, respectivamente. A presença de *E. coli* foi confirmada em 5 amostras de queijos através da detecção do gene *MalB*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 12 cepas de *E. coli* isoladas das amostras mostraram elevada resistência a Sulfonamida (41,7%) e a Tetraciclina (25,0%). Das 12 cepas de *E. coli* testadas, três cepas (25,0%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três classes de antibióticos ou mais. Com relação às bactérias *S. aureus* isoladas das amostras, as cepas apresentaram maior resistência a Sulfonamida (81,8%) e a Tetraciclina (45,5%). Quatro cepas (18,2%) apresentaram resistência total e intermediária a Cloranfenicol e a Ciprofloxacina. E quatro cepas (18,2%) foram resistentes a Cefoxitina, antibiótico usado para predizer a resistência à oxacilina mediada por gene *mecA* (MSRA). Das 22 cepas de *S. aureus* testadas, 21 cepas (95,5%) apresentaram-se resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. E 7 cepas (31,8%) classificaram-se como multirresistentes. Dessa forma, o queijo Minas frescal de fabricação informal comercializado nas feiras permanentes do Distrito Federal apresentou falta de qualidade microbiológica, risco potencial de causar toxinfecção alimentar, sendo um alimento que pode contribuir para a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos.

**Palavras-chave:** Queijo fresco; resistência antimicrobiana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; segurança dos alimentos

## ABSTRACT

Fresh Minas cheese is a highly perishable food, undergoes a lot of manipulation and has favorable characteristics to the development of microorganisms, being therefore an important target of microbiological contamination. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of informally produced fresh Minas cheese sold in permanent fairs of the Federal District. All samples in this study (100%) were unfit for consumption according to Brazilian law, with 6 samples (85.7%) exceeding the allowed limit for *S. aureus* (maximum allowable 2.7 log CFU/g), 3 samples (42.7%) had excess thermotolerant coliforms (maximum allowed 2.7 log CFU/g) and 1 sample had *Salmonella* spp. (14.3%). The bacteria *S. aureus* and *Salmonella* spp. were confirmed in cheese samples by detection of Nuc and InvA genes, respectively. The presence of *E. coli* was confirmed in 5 cheese samples by detection of the MalB gene. The antimicrobial susceptibility profile of the 12 strains of *E. coli* isolated from the samples showed high resistance to sulphonamide (41.7%) and tetracycline (25.0%). Of the 12 strains of *E. coli* tested, three strains (25.0%) were classified as multidrug resistant. Regarding *S. aureus* bacteria isolated from the samples, the strains showed more resistance to Sulfonamide (81.8%) and Tetracycline (45.5%). Four strains (18.2%) showed total and intermediate resistance to Chloramphenicol and Ciprofloxacin. And four strains (18.2%) were resistant to Cefoxitin, an antibiotic used to predict mecA gene-mediated oxacillin resistance (MSRA). Of the 22 strains of *S. aureus* tested, 21 strains (95.5%) were resistant to one of the antimicrobials tested. And 7 strains (31.8%) were classified as multidrug resistant. Thus, informally manufactured Minas fresh cheese marketed in the permanent fairs of the Federal District showed a lack of microbiological quality, a potential risk of causing food poisoning, being a food that may contribute to the spread of antibiotic resistant bacteria.

**Keywords:** fresh cheese; antimicrobial resistance; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; food safety

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Queijo Minas frescal: definição, produção e qualidade .....	11
1.2. Contaminação microbiológica de queijos Minas frescais .....	12
1.3. Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos.....	15
1.4. Resistência antimicrobiana de bactérias .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	20
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo geral: .....	20
3.2. Objetivos específicos: .....	20
4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	21
RESUMO .....	21
ABSTRACT .....	22
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas .....	24
Identificação molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> .....	26
Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E.</i> <i>coli</i> isoladas.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	43



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Nuc</i> , <i>invA</i> e <i>MalB</i> .....	27
<b>Tabela 2</b> - Antimicrobianos usados no perfil de susceptibilidade das cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	28
<b>Tabela 3</b> - Análises microbiológicas das amostras de queijos Minas frescais informais.....	29
<b>Tabela 4</b> - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>E. coli</i> isoladas das amostras de queijos Minas frescais informais.....	32
<b>Tabela 5</b> - Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de <i>E. coli</i> isoladas das amostras de queijos Minas frescais informais.....	34
<b>Tabela 6</b> - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>S. aureus</i> isoladas das amostras de queijos Minas frescais informais.....	35
<b>Tabela 7</b> - Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas das amostras de queijos Minas frescais informais.....	37

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 7.1</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene <i>MalB</i> de <i>E. coli</i> .....	49
<b>Anexo 7.2</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene <i>nuc</i> de <i>S. aureus</i> .....	49
<b>Anexo 7.3</b> - Antibiograma das bactérias <i>E. coli</i> isoladas das amostras das amostras de queijos Minas frescais informais.....	50
<b>Anexo 7.4</b> - Antibiograma das bactérias <i>S. aureus</i> isoladas das amostras das amostras de queijos Minas frescais informais.....	51
<b>Anexo 7.5</b> - Normas de submissão para a revista Higiene Alimentar.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI- Brain Heart Infusion Broth

BPF- Boas Práticas de Fabricação

°C - grau Celsius

CA-MRSA - Community-associated MRSA

CIM- Concentração Inibitória Mínima

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

FA -Fenilalanina Agar

g – gramas

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods

LIA - Lysina Iron Agar

mL - mililitros

MRSA - Methicillin Resistance Staphylococcus aureus

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

SE- Enterotoxinas

SS – Salmonella Shigella

TSI – Três Açúcares e Ferro

XLD – ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Queijo Minas frescal: definição, produção e qualidade

O queijo Minas frescal é um produto de elevado consumo no Brasil, apresenta massa crua coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada, coloração esbranquiçada e consistência mole (BRASIL, 1997). Esse queijo deve ser produzido a partir de leite tratado termicamente, independente do grau de industrialização. A legislação brasileira não permite a comercialização de queijos Minas frescos produzidos com leite cru, pois estes não passam por nenhum tipo de processo de maturação (BRASIL, 1997). O queijo Minas frescal tem pouca acidez e pelo fato de não ser maturado e ter alta umidade (>55%) deve ser armazenado em temperatura correta de refrigeração (não superior a 8°C) por apresentar curta vida de prateleira (em média de 15 dias) (SANGALETTI *et al.*, 2009; VISOTTO *et al.*, 2011).

A produção do queijo consiste num processo onde os componentes como proteína e gordura são concentrados na coalhada enquanto que as proteínas do soro são removidas. Aproximadamente 75% das proteínas do leite são aproveitadas em queijos obtidos por coagulação enzimática e o restante é perdido no soro (PAULA *et al.*, 2009). Para a produção do queijo Minas frescal, após a pasteurização do leite é necessário à adição do coalho que provoca coagulação enzimática do leite, dando origem à massa. Com o fim da coagulação, procede ao tratamento de massa, onde a mesma sofre fragmentação, com o objetivo de promover a retirada do soro. Após o procedimento de enformagem, é realizada a salga em sua superfície. Por fim, o produto é embalado, geralmente, em sacos plásticos e armazenado sob refrigeração, a fim de garantir o tempo de validade e retardar o crescimento de microrganismos contaminantes (SILVA, 2005).

O queijo Minas frescal industrializado é elaborado a partir de leite pasteurizado, em indústria de laticínio, acompanhada pelo selo do serviço de inspeção federal (BRASIL, 1997). Também existem os queijos informais, de

fabricação caseira, que não passam por controle de qualidade, não são inspecionados e comumente são comercializados em feiras, apresentando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante sua produção e conservação. Esses queijos vendidos informalmente não possuem características que estabelecem padrões mínimos de segurança alimentar, como: data de validade e fabricação, descrição da origem do produto e selos de inspeção. Em feiras é comum esses queijos serem expostos em prateleiras, sem nenhum tipo de refrigeração (AMORIN, 2013; FERREIRA et al., 2011; SILVA, 2015; VISOTTO et al., 2011).

Os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado problemas relacionados à qualidade microbiológica. As falhas na aplicação de boas práticas de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas são alguns dos fatores que comprometem a qualidade (FERREIRA et al., 2011; SILVA, 2015; VISOTTO et al., 2011).

## **1.2. Contaminação microbiológica de queijos Minas frescais**

Queijos são em geral produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. Quando a produção do queijo é feita de maneira informal, as boas práticas de fabricação (BPF) nem sempre são seguidas, ocorrendo microrganismos contaminantes de origens animal, ambiental ou do manipulador, podendo ocorrer a transmissão de doenças através desses alimentos (KOMATSU et al., 2010).

Bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. podem estar presentes nos queijos Minas frescais de má qualidade, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e consistem em perigo para a saúde do consumidor (BARANCELLI et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; PINTO et al., 2011; SANTOS, HOFFMANN, 2010). Também na maioria dos surtos de DTA's, a contaminação é devido a manipulação inadequada, pelo armazenamento incorreto da matéria prima, hábitos inconstantes de

higienização das mãos antes de manipular o alimento, temperatura inadequada, e falta do controle de qualidade na aquisição dos produtos (GONÇALVES, *et al.*, 2014).

*Staphylococcus aureus* é a espécie contaminante entre o gênero *Staphylococcus* mais prevalente em leite e queijos, incluindo principalmente os informais pelos quais o controle sanitário não é monitorado, e assim, são frequentemente associados aos surtos alimentares (DIEDRICH *et al.*, 2013). O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies, no entanto a espécie *S. aureus* está mais relacionada a casos de surtos alimentares devido a produção de enterotoxinas (ZOCHE & SILVA, 2012).

*S. aureus* é um microrganismo patogênico com cepas capazes de produzir enterotoxinas que após pré-formadas e ingeridas com o alimento podem causar intoxicação alimentar. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas no sistema gastrointestinal, permanecendo ativas após a ingestão. Elas também são termoestáveis, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização (ZOCHE & SILVA, 2012).

As enterotoxinas (SE) produzidas por *S. aureus* são caracterizadas por causar náuseas, vômitos, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, câimbra muscular, queda da pressão sanguínea e prostração. As SE possuem uma estrutura que confere resistência a enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, renina e papaína e que, dessa forma, resistem à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão. Entre outras propriedades, as enterotoxinas são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, e não são inativadas totalmente pela pasteurização e por outros tratamentos térmicos usuais (DIAS *et al.*, 2011).

A presença de coliformes totais no queijo Minas frescal é um importante indicador de condições higiênicas insatisfatórias. Os coliformes totais são compostos por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar lactose produzindo ácido e gás num período de 24-48 horas a 32-37°C. São

bacilos Gram-negativos, sendo anaeróbios facultativos (AMORIM *et al.*, 2014; APOLINÁRIO *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2016). As bactérias do grupo coliforme em altas quantidades são consideradas as principais causadoras de deterioração de queijos, o que causa estufamento precoce dos produtos e fermentações anormais (FERREIRA *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2011).

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. Dentre essas espécies, *E. coli* é a que apresenta maior importância médica, podendo causar infecções intestinais, infecções urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecções. Sua presença na sala de ordenha resulta da introdução de animais oriundos de ambiente contaminado, já que essas bactérias estão presentes no esterco, água sem tratamento e solo (CHAPAVAL *et al.*, 2010). Os coliformes termotolerantes constituem um subgrupo dos coliformes totais que fermentam a lactose entre 45° em 24 horas, sendo o principal representante a espécie *E. coli*, de origem exclusivamente fecal (FERREIRA *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2011; SANGALETTI *et al.*, 2009).

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram-negativos que não possuem esporos e são anaeróbios facultativos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. São capazes de crescer em diferentes meios de cultura, formando colônias visíveis em 24 horas a 37°C. A contaminação dos alimentos por *Salmonella* spp. pode causar a salmonelose, principalmente de origem animal. Esse patógeno está presente com maior prevalência no sorotipo *Enteritidis*, no qual os casos e surtos acontecem em vários países (MOORE; GORSS, 2010). A dose infectante para a manifestação da doença geralmente é de  $1,0 \times 10^6$  células por grama de alimento ingerido. O período de incubação dessa doença varia entre 8 e 72 horas após a invasão da mucosa intestinal (BORGES, 2010).

A RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, determina para o queijo Minas frescal a quantidade limite para coliformes a 45°C de 2,7 log NMP/g,

para *S. aureus* de 2,7 log UFC/g e *Salmonella spp.* deve estar ausente em 25 g do produto.

### **1.3. Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos**

Para avaliar a segurança alimentar de determinado alimento e definir critérios de aceitação são realizados testes microbiológicos, no entanto, estes possuem algumas limitações sendo necessário métodos demorados para a detecção de patógenos. Dessa forma, o desenvolvimento de análises de alimentos mais sensíveis e rápidos do que os métodos tradicionais têm ganhado destaque nos últimos anos (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Os métodos para detecção microbiológica podem ser divididos em cultivo convencional de células e processos mais rápidos, baseados em métodos imunológicos e moleculares. Os métodos convencionais de cultivo de células geralmente demandam dias antes da colônia do organismo-alvo ficar visível, podendo assim, haver resultados contestáveis. Esses métodos são fáceis de usar, porém requerem pessoas qualificadas para preparo da amostra e interpretação dos resultados (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Os métodos imunológicos são baseados principalmente na afinidade entre antígeno e o anticorpo, utilizando o ensaio imunoenzimático indireto (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). Já os métodos moleculares têm por base a PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo o método baseado no DNA. Embora seja mais caro é obtido maior produtividade da análise, pois múltiplas amostras podem ser processadas de forma simultânea utilizando procedimentos automatizados (DE MEDEIROS, 2013).

No decorrer dos anos têm sido utilizados técnicas moleculares como forma de identificação e caracterização de bactérias. Dessas técnicas encontra-se a PCR, pelo qual realiza detecções de microrganismos em diferentes amostras (AHMADI *et al.*, 2010; DIEDRICH *et al.*, 2013). A técnica de PCR é realizada por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores, os chamados *primers*, sobre um DNA molde, que

visa a produção de milhões de cópias desta sequência. É uma técnica automatizada, em que um aparelho denominado termociclador é capaz de alternar repetidamente entre temperaturas ótimas para cada etapa específica do ciclo de amplificação: desnaturação, anelamento e extensão (SCHEIDEGGER, 2009).

Com a utilização da PCR torna-se possível detectar genes envolvidos com a patogenicidade de isolados bacterianos adquirindo assim a sua identificação. A aplicação da PCR envolve a amplificação de uma região específica do DNA, afim de detectar o *locus* de virulência (COSTA *et al.*, 2010). De acordo com ANDRADE *et al.* (2010), a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pelas técnicas microbiológicas.

Num estudo sobre detecção e diferenciação de categorias de *E. coli* diarréicas, foi feita a diferenciação entre espécies não patogênicas da microbiota intestinal e foram identificados os fatores de virulência de cada categoria com capacidade de causar determinada patologia. Para isso a aplicação da PCR foi relevante para detectar os genes envolvidos com a patogenicidade dos isolados bacterianos e possível identificação do patógeno (COSTA *et al.*, 2010).

No estudo de ZOCHE & SILVA (2012), a PCR foi capaz de detectar em amostras de queijos Minas artificialmente contaminadas com *S. aureus* em concentrações  $\geq 10^2$  UFC g<sup>-1</sup>, os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*. Os autores relataram que poucos trabalhos descrevem técnicas moleculares para diagnóstico desses microrganismos diretamente em queijos.

#### **1.4. Resistência antimicrobiana de bactérias**

O descobrimento de diferentes antimicrobianos no decorrer dos anos gerou grande expectativas em relação ao tratamento de doenças infecciosas e na prevenção de processos infecciosos. Entretanto, o uso irracional dos medicamentos antimicrobianos gera uma questão preocupante de resistência



(MICHAEL *et al.*, 2015). A resistência a agentes antimicrobianos é um problema de saúde humana e também um problema em medicina veterinária. Em diversos estudos observou-se que o uso de antimicrobianos em animais contribuiu para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana em humanos. Isso acontece porque muitos medicamentos utilizados em seres humanos são também usados em animais em casos de doenças infecciosas e muitas das medicações são comercializadas sem o controle fiscal, tanto no âmbito da saúde humana quanto veterinária (HENRIQUE *et al.*, 2012; FRANÇA, 2017).

As bactérias resistentes, muitas vezes, existem na natureza antes da utilização de antibióticos pelo homem. O emprego destas substâncias intensivamente favorece a seleção de estirpes resistentes e é a causa da transformação de populações bacterianas sensíveis em populações resistentes (INSA, 2010). A resistência a fármacos antimicrobianos possui duas classificações podendo ser constitutiva e adquirida. Na resistência constitutiva o microrganismo é resistente devido aos próprios mecanismos celulares que não estão presentes na célula. Já a adquirida envolve os mecanismos de mutação no qual ocorre mudanças nas sequências de DNA cromossômico devido aos antibióticos (BAPTISTA, 2013; PANKEY & SABATH, 2013).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos ocorre através de dois mecanismos: mutação cromossomal que envolve a modificação do alvo ou transferência horizontal de genes, onde os genes responsáveis pela resistência estão nos plasmídeos, os quais geralmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Na transferência horizontal de genes o material genético é transferido entre as bactérias e pode acontecer por meio de 3 rotas principais: transformação, transdução e conjugação (BAPTISTA, 2013).

Na transformação ocorre a transferência do gene do DNA de uma célula para outra, ao passo que na transdução o DNA de um plasmídeo é incorporado por um vírus bacteriano e então transferido para outra bactéria. Na conjugação ocorre a transferência genética no qual uma bactéria doadora sintetiza uma fímbria sexual, que se liga a uma bactéria receptora em um processo de

acasalamento e transfere cópias de genes plasmidiais para os receptores (HOLMES *et al.*, 2016).

Com base nesse contexto, o estudo do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* merecem destaque, pois é de elevada relevância para a saúde mundial. Vários estudos mostraram que a resistência antimicrobiana, pelo menos em parte, emergiu como resultado da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos fora da medicina humana, principalmente na medicina veterinária, na produção de animais e peixes e na agricultura (HOLMES *et al.*, 2016).

Assim, os testes de sensibilidade de antimicrobianos são indicados para organismos que causam um processo infeccioso e requerem terapia antimicrobiana, e com maior frequência são indicados quando o organismo em questão é de uma espécie capaz de demonstrar resistência aos antimicrobianos utilizados (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Para realizar esses testes sensibilidade, é realizado o antibiograma que consiste na determinação “in vitro” da sensibilidade de um organismo a um grupo de antimicrobianos. O método de disco-difusão é uma técnica amplamente utilizada na rotina de laboratórios clínicos que realizam testes de sensibilidade antimicrobiana, podendo ser usado também em casos de bactérias fastidiosas. Esse método é feito através da medida do halo de inibição de um organismo sendo relacionado com a concentração mínima de um fármaco antimicrobiano e a classificação de cepas como sensíveis ou resistentes (BrCAST, 2016). Kirby e Bauer é a metodologia para antibiograma mais utilizada devido ao baixo custo, praticidade na execução e confiabilidade nos resultados. Além disso, é um importante método para identificar os microrganismos resistentes (LABORCLIN, 2011).

O teste de sensibilidade antimicrobiana envolve a padronização da interpretação dos resultados, podendo ser mensurado conforme o diâmetro do halo de inibição e classificado como sensível (S), Intermediário (I) e resistente (R). A categoria sensível indica que a dose recomendada do antimicrobiano é suficiente para tratar a infecção, a intermediária inclui os isolados com CMI

(concentração mínima inibitória) do agente antimicrobiano nos quais as taxas de resposta podem ser menores que os isolados sensíveis, mas que é possível uma dose maior que o normal. Logo, na categoria de resistência, as cepas não são inibidas pelas doses de antimicrobianos, geralmente recomendadas durante o regime terapêutico (CLSI, 2013).

Diante disso, há relatos pelo qual a bactéria *S. aureus* está envolvida numa série de enfermidades infecciosas. A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um patógeno emergente nas infecções hospitalares, pois as cepas isoladas apresentavam resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (TOHIDPOUR *et al.*, 2010). As cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*). Houve rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares e nos últimos 10 anos, as cepas de MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de *Community-associated MRSA* (CA-MRSA) (BENOIT *et al.*, 2008).

Um estudo realizado nos Estados Unidos da América mostrou que 80% dos pacientes com infecções de pele e partes moles receberam tratamento empírico, destes, 57% não responderam ao tratamento, pois o microrganismo apresentou resistência. Esses achados sugerem a necessidade de reconsiderar as escolhas de tratamentos empíricos para infecções em pele e tecidos moles em áreas onde MRSA é prevalente na comunidade (GELATTI, 2009).

### 3. JUSTIFICATIVA

O queijo Minas frescal de fabricação informal, por se tratar de um alimento que apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, e ser bastante manipulado por indivíduos sem capacitação, além de ser produzido em locais que geralmente não possuem estrutura física adequada para realizar o preparo do produto, é um alvo importante de contaminação microbiológica. Considerando o alto consumo desse alimento pela população do Distrito Federal, torna-se importante a realização de pesquisas que avaliem a qualidade microbiológica desse produto.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo avaliar amostras de queijos Minas frescos de fabricação informal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal, com ênfase na ocorrência de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*

#### 4.2. Objetivos específicos:

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella spp.*
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas utilizando o método de difusão com disco (metodologia de Kirby-Bauer).

## **5. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS INFORMAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

Bruna Barros da Silva, Daniela Castilho Orsi, Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

#### **RESUMO**

O queijo Minas frescal é um alimento altamente perecível, sofre muita manipulação e apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, sendo por isso um alvo importante de contaminação microbiológica. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas frescais de fabricação informal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal. Todas as amostras deste estudo (100%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que 6 amostras (85,7%) excederam o limite permitido para *S. aureus* (máximo permitido de 2,7 log UFC/g), 3 amostras (42,7%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes (máximo permitido de 2,7 log UFC/g) e 1 amostra teve a presença de *Salmonella* spp. (14,3%). As bactérias *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram confirmadas nas amostras de queijos através da detecção dos genes Nuc e InvA, respectivamente. A presença de *E. coli* foi confirmada em 5 amostras de queijos através da detecção do gene MalB. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 12 cepas de *E. coli* isoladas das amostras mostraram elevada resistência a Sulfonamida (41,7%) e a Tetraciclina (25,0%). Das 12 cepas de *E. coli* testadas, três cepas (25,0%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três classes de antibióticos ou

mais. Com relação às bactérias *S. aureus* isoladas das amostras, as cepas apresentaram mais resistência a Sulfonamida (81,8%) e a Tetraciclina (45,5%). Quatro cepas (18,2%) apresentaram resistência total e intermediária a Cloranfenicol e a Ciprofloxacina. E quatro cepas (18,2%) foram resistentes a Cefoxitina, antibiótico usado para prever a resistência à oxacilina mediada por gene *mecA* (MSRA). Das 22 cepas de *S. aureus* testadas, 21 cepas (95,5%) apresentaram-se resistentes um dos antimicrobianos testados. E 7 cepas (31,8%) classificaram-se como multirresistentes. Dessa forma, o queijo Minas frescal de fabricação informal comercializado nas feiras permanentes do Distrito Federal apresentou falta de qualidade microbiológica, risco potencial de causar toxinfecção alimentar, sendo um alimento que pode contribuir para a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos.

**Palavras-chave:** queijo fresco; resistência antimicrobiana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; segurança dos alimentos

## **ABSTRACT**

Fresh Minas cheese is a highly perishable food, undergoes a lot of manipulation and has favorable characteristics to the development of microorganisms, being therefore an important target of microbiological contamination. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of informally produced fresh Minas cheese sold in permanent fairs of the Federal District. All samples in this study (100%) were unfit for consumption according to Brazilian law, with 6 samples (85.7%) exceeding the allowed limit for *S. aureus* (maximum allowable 2.7 log CFU/g), 3 samples (42.7%) had excess thermotolerant coliforms (maximum allowed 2.7 log CFU/g) and 1 sample had *Salmonella* spp. (14.3%). The bacteria *S. aureus* and *Salmonella* spp. were confirmed in cheese samples by detection of Nuc and InvA genes, respectively. The presence of *E. coli* was confirmed in 5 cheese samples by detection of the MalB gene. The antimicrobial susceptibility profile of the 12 strains of *E. coli* isolated from the

samples showed high resistance to sulphonamide (41.7%) and tetracycline (25.0%). Of the 12 strains of *E. coli* tested, three strains (25.0%) were classified as multidrug resistant. Regarding *S. aureus* bacteria isolated from the samples, the strains showed more resistance to Sulfonamide (81.8%) and Tetracycline (45.5%). Four strains (18.2%) showed total and intermediate resistance to Chloramphenicol and Ciprofloxacin. And four strains (18.2%) were resistant to Cefoxitin, an antibiotic used to predict *mecA* gene-mediated oxacillin resistance (MSRA). Of the 22 strains of *S. aureus* tested, 21 strains (95.5%) were resistant to one of the antimicrobials tested. And 7 strains (31.8%) were classified as multidrug resistant. Thus, informally manufactured Minas fresh cheese marketed in the permanent fairs of the Federal District showed a lack of microbiological quality, a potential risk of causing food poisoning, being a food that may contribute to the spread of antibiotic resistant bacteria.

**Keywords:** fresh cheese; antimicrobial resistance; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; food safety

## INTRODUÇÃO

O queijo Minas frescal é um produto tipicamente brasileiro, sendo bastante consumido no país por se tratar de um produto de baixo custo e elevada oferta no mercado (PASSOS *et al.*, 2009). Entende-se por queijo minas frescal, o queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Apresenta massa crua coalhada, dessorada, salgada e não maturada, coloração esbranquiçada e consistência mole (BRASIL, 1997).

Os queijos vendidos informalmente não possuem características que estabelecem padrões mínimos de segurança alimentar, como: data de validade e fabricação, descrição da origem do produto e selos de inspeção. Em feiras é

comum esses queijos serem expostos em prateleiras, sem nenhum tipo de refrigeração (FERREIRA *et al.*, 2011; SILVA, 2015; VISOTTO *et al.*, 2011).

Devido a seu alto teor de umidade e por ser manipulado, o queijo Minas frescal apresenta condições propícias à contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, podendo estas bactérias ser patogênicas e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (VISOTTO *et al.*, 2011). Dessa forma, bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* podem estar presentes nos queijos minas frescal de má qualidade (FERREIRA *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2011; SANTOS, HOFFMANN, 2010).

Outro fator preocupante acerca da qualidade microbiológica do queijo minas frescal é que as bactérias potencialmente patogênicas presentes possam apresentar resistência a antibióticos. Estudos recentes confirmaram que microrganismos resistentes a antimicrobianos veiculados por alimentos podem transferir genes de resistência a bactérias presentes no trato intestinal humano, inclusive para bactérias potencialmente patogênicas presentes na microbiota (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2016).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar amostras de queijos Minas frescos de fabricação informal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal, com ênfase na ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas**

As 7 amostras de queijos Minas frescos de fabricação informal analisadas neste estudo foram coletadas em 3 feiras permanentes do Distrito Federal. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente



analisadas. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até  $10^{-3}$ ).

Para a contagem total de bactérias mesófilas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lactosado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g.

Para a contagem de *S. aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem suplementado com 6% de cloreto de sódio. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de gram. As colônias

suspeitas de *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 mL das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetracionato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Salmonella Shigella (SS) e/ou Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo os meios bioquímicos: Ágar TSI (três açúcares e ferro), Ágar LIA (Lysina Iron Agar) e Ágar FA (Fenilalanina Agar). Posteriormente as colônias suspeitas de *Salmonella* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

### **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli***

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 105 pares de base referente ao gene *Nuc*. Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o fragmento de 445 pares de base referente ao gene *invA*. E para a identificação de *E. coli* foi utilizado o fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Nuc*, *invA* e *MalB***

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>Nuc forward</i>	TGTTTGTGATGCATTTGCTG		
<i>Nuc reverse</i>	AAAGGGCAATACGCAAAGAG	105 pb	<i>S. aureus</i>
<i>invA forward</i>	GCTGATGCCGGTGAAATTAT		
<i>invA reverse</i>	CGACAAGACCATCACCAATG	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>MalB forward</i>	TCTATGGGCTGTGACTGCTG		
<i>MalB reverse</i>	GGCATCCCCATGATGTAGTT	113 pb	<i>E. coli</i>

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* ou *Salmonella* spp. ou *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHERY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNA/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termo ciclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNA/HindIII (JENA®).

## Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias *S. aureus* e *E. coli* isoladas

A susceptibilidade das cepas de *S. aureus* e *E. coli* aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (30 µg) (β-lactâmico/Penicilina), Ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Cefoxitina (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Gentamicina (10 µg) (Aminoglicosídeo), Cloranfenicol (30 µg) (Fenicol), Imipenem (10 µg) (β-lactâmico/Carbapenem), Tetraciclina (30 µg) (Tetraciclina), Ciprofloxacina (5 µg) (Quinolona), Sulfonamida (300 µg) (Sulfonamida), Eritromicina (15 µg) (Macrolídeo) e Vancomicina (30 µg) (Glicopeptídeo) (NEWPROV®) (Tabela 2). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2013).

**Tabela 2 - Antimicrobianos usados no perfil de susceptibilidade das cepas de *S. aureus* e *E. coli***

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Classe</b>	<b>Conteúdo do disco (µg)</b>
Amoxicilina com Ácido Clavulânico	Penicilínico e inibidor das b-lactamases	AMC 30
Ceftazidima	Cefalosporinas	CAZ 30
Cefotaxima	Cefalosporinas	CTX 30
Cefoxitina	Cefalosporinas	CFO 30
Gentamicina	Aminoglicosídeo	GEN 10
Cloranfenicol	Fenicol	CLO 30
Imipenem	Carbapenem	IMP 10
Tetraciclina	Tetraciclina	TET 30
Ciprofloxacina	Quinolona	CIP 05
Sulfonamida	Inibidores de folato	SUL 300
Eritromicina	Macrolídeo	ERI 15
Vancomicina	Glicopeptídeo	VAN 30

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises microbiológicas das amostras de queijos Minas frescos informais realizadas neste estudo. Todas as amostras deste estudo (100%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que 6 amostras (85,7%) excederam o limite permitido para *S. aureus* (máximo permitido de 2,7 log UFC/g), 3 amostras (42,7%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes (máximo permitido de 2,7 log UFC/g) e 1 amostra teve a presença de *Salmonella* spp. (14,3%). As bactérias *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram confirmadas nas amostras de queijos através da detecção dos genes Nuc e InvA, respectivamente. A presença de *E. coli* foi confirmada em 5 amostras (71,4%) de queijos através da detecção do gene MalB.

**Tabela 3 - Análises microbiológicas das amostras de queijos Minas frescos informais**

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)
1 FC	5,56 ± 0,46	3,04 ± 0,86	3,04 ± 0,01	Presença	2,88 ± 0,17
2 SOS	6,40 ± 0,04	2,01 ± 0,93	0,95 ± 0,48	Ausência	4,08 ± 0,08
3 CEI	8,02 ± 0,14	3,04 ± 0,01	1,13 ± 0,29	Ausência	3,90 ± 0,01
4 FCX	6,20 ± 0,38	3,04 ± 0,00	2,82 ± 0,38	Ausência	4,88 ± 0,68
5 AB	5,80 ± 0,07	3,04 ± 0,00	2,54 ± 0,86	Ausência	5,17 ± 0,12
6 CA	6,52 ± 0,6	3,04 ± 0,00	1,25 ± 0,07	Ausência	3,83 ± 0,86
7 SH	6,87 ± 0,55	3,04 ± 0,00	2,84 ± 0,33	Ausência	ND

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições, ND = não detectado.

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* são bactérias indicadoras de falhas no processamento, produção ou armazenamento de alimentos, e assim a presença desses microrganismos no geral, podem avaliar os aspectos da qualidade dos mesmos (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). Conforme a ICMSF (1984), os microrganismos podem ser classificados como os que não oferecem riscos à saúde como as bactérias mesófilas e psicotróficas, e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde, como coliformes totais, coliformes fecais enterococos, enterobactérias totais e *Escherichia coli*.

As bactérias mesófilas são aquelas cujo crescimento varia entre 10°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30°C, esse grupo inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal podendo atingir contagens maiores quando o alimento é mantido à temperatura ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

As bactérias psicotróficas podem ser tanto gram-positivas quanto gram-negativas, e esses microrganismos crescem em baixas temperaturas, geralmente abaixo de 7°C e são os principais agentes que causam a deterioração do leite cru refrigerado e seus derivados (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Essas bactérias podem ser eliminadas pela pasteurização adequada, mas algumas enzimas hidrolíticas são termoresistentes e causam reações bioquímicas nos constituintes, provocando alterações físicas e sabores indesejáveis ao leite. Elas podem atuar no leite cru, enquanto estocado e também no leite que foi pasteurizado e nos derivados lácteos (NORNBERG *et al.*, 2009).

Segundo FERNANDES e GOIS (2015) os coliformes totais são bacilos gram-negativos não formadores de esporos capazes de fermentar a lactose e produzir gás ao serem incubados a 35-37°C entre 24 e 48 horas. Apesar de estarem presentes nas fezes também são encontrados na vegetação e no solo. Assim, a presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente a contaminação fecal recente ou de enteropatógenos (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014).

Os coliformes termotolerantes incluem os coliformes totais que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a temperaturas entre 44°C e 45°C em 24 horas. A presença de *Escherichia coli* é o principal bioindicador de origem fecal que está presente no trato intestinal de animais de sangue quente (BARBOSA *et al.*, 2009).

Na literatura outros trabalhos também reportaram um elevado índice de amostras de queijos Minas frescais reprovadas para o consumo. No estudo de SALEH *et al.* (2019) foram analisadas 19 amostras de queijos Minas frescais obtidos em supermercados de Duque de Caxias/RJ e em todas as amostras (100%) foram observadas contagens de *S. aureus* superiores ao permitido em legislação. No estudo de APOLINÁRIO *et al.* (2014), 80,6% (25/31) das amostras de queijos Minas frescais produzidos por laticínios do estado de Minas Gerais se apresentaram impróprias para consumo por apresentar microrganismos acima dos limites estabelecidos pela legislação (54,8% para coliformes termotolerantes, 16,1% para *S. aureus* e 9,6% para *Listeria monocytogenes*).

SOUZA *et al.* (2017) avaliaram a qualidade microbiológica de 50 queijos Minas frescais (43 de produção industrial e 7 informais) comercializados na Zona da Mata Mineira provenientes de seis municípios. Dentre as amostras, 20 (40%) apresentaram coliformes a 45°C acima do limite máximo estabelecido. A presença de *E. coli* foi confirmada em 16 amostras (32%). As contagens de *S. aureus* também foram acima do limite aceito em 10 (20%) amostras e *Salmonella* spp. foi confirmada em 20 amostras (40%). Constatou-se que a maioria das amostras, 39 de 50 (78%), estavam impróprias para o consumo.

No trabalho de GARCIA *et al.* (2016) foram analisadas 18 amostras de queijos frescos artesanais comercializados na região de Montes Claros/MG. Os resultados mostraram que 94% dos queijos analisados apresentaram excesso de coliformes termotolerantes e a *Salmonella* spp. foi positiva em 63% das amostras. O trabalho de YAMANAKA *et al.* (2016) avaliou a qualidade microbiológica de 32 amostras de queijos Minas frescais informais adquiridos em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões

metropolitanas de dez capitais brasileiras (Porto Alegre, Curitiba, São Paulo, Belo Horizonte, Salvador, Recife, Natal, Fortaleza, Manaus e Brasília). As amostras foram obtidas de diferentes produtores, nenhuma delas possuía o selo de inspeção sanitária e 62,5% das amostras de queijos (20/32) estavam impróprias para o consumo (50% para *E. coli*, 34,4 % para *S. aureus* e 6,3% para *Salmonella spp*).

A Tabela 4 apresenta o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *E. coli* isoladas das amostras de queijos desse estudo. No presente estudo, as cepas de *E. coli* apresentaram mais resistência a Sulfonamida (50,0 %) e a Tetraciclina (25,0%). Os antibióticos aos quais as cepas de *E. coli* apresentaram maior sensibilidade foram: Cloranfenicol (100%), Ciprofloxacina (100,0 %) e Imipenem (91,7%).

**Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *E. coli* isoladas das amostras das amostras de queijos Minas frescas informais**

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
Amoxicilina*	10 (83,3%)	0%	2 (16,7%)	>18	14-17	< 13
Sulfonamida	6 (50,0%)	0%	<b>6 (50,0%)</b>	>17	13-16	< 12
Gentamicina	10 (83,3%)	0%	2 (16,7%)	>15	13-14	< 12
Tetraciclina	9 (75,0%)	0%	<b>3 (25,0%)</b>	>15	12-14	< 11
Cloranfenicol	<b>12 (100%)</b>	0%	0%	>18	12-18	< 12
Ciprofloxacina	<b>12 (100%)</b>	0%	0%	>21	16-20	< 15
Imipenem	<b>11 (91,7%)</b>	1 (8,3%)	0%	>23	20-22	< 19
Ceftazidima	<b>11 (91,7%)</b>	0%	1 (8,3%)	>21	18-20	< 17
Cefotaxima	10 (83,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	>26	23-25	< 22

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 12 cepas. \*amoxicilina com ácido clavulânico. Valores de referência da CLSI: HALO S; HALO I; HALO R.



No estudo de SILVA (2018) 100% dos queijos analisados tiveram bactérias Gram-negativas isoladas resistentes sulfametoxazol-trimetoprima (antibiótico da classe das sulfonamidas) e 93,3% com resistência a tetraciclina. O uso das sulfonamidas, tanto na medicina humana quanto na veterinária, tem levado à resistência a estes compostos em bactérias. A resistência ocorre geralmente pela aquisição de dois genes denominados *sul1* e *sul2*, que codificam uma enzima necessária à síntese do ácido fólico. As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas e de largo espectro de ação. Atuam na síntese do ácido fólico, necessário para a síntese do ácido nucleico, interferindo assim na síntese do DNA (ALTERTHUM, 2008).

Sabe-se que, embora atualmente o uso das tetraciclinas seja controlado, elas já foram amplamente utilizadas na medicina veterinária em todo o mundo, o que garantiu a persistência de genes de resistência nas bactérias patogênicas dos animais e facilitou a sua mobilização para patógenos humanos (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2016). FLÓREZ *et al.* (2014) reportaram a ocorrência dos genes *tet* de resistência a tetraciclina, detectados por PCR a partir do DNA de queijos artesanais e industriais típicos da Espanha e Itália.

Os genes *tet* são responsáveis por mecanismos que induzem mudanças conformacionais. A tetraciclina fica então impedida de se ligar ao ribossomo para impedir a síntese de proteínas, a ação pode acontecer também de forma que ocorra a dissociação de tetraciclina já ligada ao ribossomo (BROOKS *et al.*, 2014). MONTAZ *et al.* (2012) identificaram genes de resistência a antibióticos em cepas de *E. coli* isoladas de 719 amostras de leite e produtos lácteos tradicionais do Irã. Das amostras estudadas, 102 apresentaram *E. coli* com resistência a tetraciclina, com identificação dos genes *Tet A* e/ou *Tet B* em 64% das amostras positivas.

Neste estudo, das 12 cepas de *E. coli* testadas, seis cepas (50,0%) mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados e três cepas (25,0%) apresentaram-se resistentes a um ou dois tipos de antimicrobianos. Três cepas (25,0%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas

resistentes a três classes de antibióticos ou mais. A Tabela 5 apresenta os perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *E. coli* desse estudo.

**Tabela 5 - Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas das amostras de queijos Minas frescos informais**

Perfis	Resistência Antimicrobiana	Número de antimicrobianos*	Número de cepas (%)**
1	SUL, TET, GEN, CAZ, CTX	5	1 (8,3%)
2	SUL, TET, GEN, AMC	4	1 (8,3%)
3	SUL, TET, AMC	3	1 (8,3%)

\* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência; Número de cepas (%) \*\* = número de cepas com perfil de resistência e porcentagem em relação ao total de 12 cepas; SUL = Sulfonamida, TET = Tetraciclina, GEN = Gentamicina, CAZ = ceftazidima, CTX = cefotaxima, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico.

No estudo de OMBARAK et al. (2018) determinou-se o perfil de resistência antimicrobiana em 222 isolados de *E. coli* provenientes de 187 amostras (leite cru e queijos populares do Egito). Entre os 222 isolados de *E. coli*, 66 (29,7%) eram resistentes a um ou mais antimicrobianos, e metade desses isolados resistentes (14,9%) apresentou fenótipo de resistência a múltiplas drogas (resistência a pelo menos três classes diferentes de medicamentos). Os autores concluíram que cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos estão amplamente distribuídas no ambiente de produção e processamento de leite no Egito e podem desempenhar um papel na disseminação da resistência antimicrobiana a outras bactérias patogênicas e comensais.

A Tabela 6 apresenta o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *S. aureus* isoladas das amostras de queijos desse estudo. As cepas de *S. aureus* apresentaram mais resistência a Sulfonamida (81,8%) e a Tetraciclina (45,5%). Quatro cepas (18,2%) apresentaram resistência total e intermediária a Cloranfenicol e a Ciprofloxacina. E os antibióticos aos quais as

cepas apresentaram maior sensibilidade foram: Gentamicina (90,9%) e Vancomicina (90,9%).

**Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *S. aureus* isoladas das amostras de queijos Minas frescos informais**

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
<b>Sulfonamida</b>	3 (13,6%)	1 (4,50%)	<b>18 (81,8%)</b>	>17	13-16	<12
<b>Gentamicina</b>	<b>20 (90,9%)</b>	0%	2 (9,09%)	>15	13-14	<12
<b>Tetraciclina</b>	12 (54,5%)	0%	<b>10 (45,5%)</b>	>19	15-18	<14
<b>Cloranfenicol</b>	18 (81,8%)	2 (9,09%)	2 (9,09%)	>18	13-17	<12
<b>Ciprofloxacina</b>	19 (86,4%)	2 (9,09%)	1 (4,50%)	>21	16-20	<15
<b>Cefoxitina</b>	18 (81,8%)	-	4 (18,2%)	≥25	-	≤24
<b>Eritromicina</b>	17 (72,3%)	3 (13,6%)	2 (9,09%)	>23	14-22	<13
<b>Vancomicina</b>	<b>20 (90,9%)</b>	-	-	≥15	-	-

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 22 cepas. Valores de referência da CLSI: HALO S; HALO I; HALO R.

Segundo a CLSI (2013) todo isolado de estafilococo cujo diâmetro do halo da vancomicina for igual ou inferior a 14mm deve ser testado usando um método de CIM (concentração inibitória mínima) de referência. O teste de disco difusão não diferencia as cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina das cepas sensíveis, mesmo quando incubadas por 24 horas. No entanto, uma placa de triagem de ágar BHI com uma determinada quantidade de vancomicina pode ser inoculada para aumentar a sensibilidade de detecção de cepas de *S. aureus* com resistência intermediária e cepas resistentes à vancomicina. Dessa forma, isolados não sensíveis são raros, assim quaisquer estafilococos com CIM elevada para vancomicina (≥8 µg/mL), é recomendado encaminhar a um laboratório de referência.

No estudo de MARTINI *et al.* (2017) 90 isolados de *S. aureus* oriundos de leite de vaca cru com mastite mostraram resistência a ampicilina e/ou tetraciclina. No estudo de VIEIRA *et al.* (2016) sobre o uso de antibióticos em rebanhos bovinos no norte de Minas Gerais identificou-se que os antibióticos mais utilizados contra a mastite foram a tetraciclina e os aminoglicosídeos como a gentamicina.

Neste estudo quatro cepas (18,2%) foram resistentes a Cefoxitina. Para *S. aureus*, o teste com cefoxitina é comparável ao teste com oxacilina para prever a resistência à oxacilina mediada por gene *mecA* (MSRA); sendo a leitura do teste com cefoxitina mais fácil que do teste com oxacilina e, portanto, este é o método de preferência. Estafilococos oxacilina-resistentes são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos (BrCAST/EUCAST, 2019; CLSI, 2013).

O gene *mecA* codifica a proteína PBP2A, a qual tem baixa afinidade para antibióticos beta-lactâmicos, como meticilina e penicilina. O gene *mecA* é um importante marcador de resistência em espécies de *Staphylococcus* e a relativa facilidade de transferência deste elemento genético é umas das explicações para a resistência crescente a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (GOMROKI *et al.*, 2015). O trabalho realizado por FONTES *et al.* (2013), reportou a presença do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativos isolados de queijos Minas Frescal industrializados coletados na cidade de Juiz de Fora.

Neste estudo a maioria das cepas (90,9%) foram sensíveis à Vancomicina. A resistência à vancomicina não foi relatada, pois todo isolado de estafilococo cujo diâmetro do halo da vancomicina for igual ou inferior a 14 mm deve ser testado usando um método de CIM de referência. O teste de disco difusão não diferencia as cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina (CIMs 4-8  $\mu\text{g/mL}$ ) das cepas sensíveis (CIM faixa de 0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ ) (BrCAST/EUCAST 2019; CLSI, 2013).

Das 22 cepas de *S. aureus* testadas, vinte e uma cepas (95,45 %) apresentaram-se resistentes um dos antimicrobianos testados. Quatorze cepas

(63,63%) apresentaram-se resistentes a um ou dois tipos de antimicrobianos. E sete cepas (31,81%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três classes de antibióticos ou mais. A Tabela 7 apresenta os perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *S. aureus* desse estudo.

No estudo de PEXARA et al. (2016) das 45 cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos provenientes de tanques de leite ovino e caprino, 13,3% (6/45) dos isolados se mostraram multirresistentes a até 5 diferentes antibióticos. No Brasil, desde 2009, a legislação proibiu a utilização do grupo das quinolonas (do qual a ciprofloxacina faz parte), dos anfenicóis, das tetraciclina, dos beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas) e sulfonamidas como aditivo melhorador de desempenho ou como conservante de alimento para animais, sendo estes de uso exclusivo na medicina veterinária (BRASIL, 2009).

**Tabela 7. Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de queijos Minas frescais informais**

Perfis	Resistência Antimicrobiana	Número de antimicrobianos*	Número de cepas (%)**
1	CLO, TET, ERI	3	1 (4,50%)
2	CLO, SUL, TET	3	1 (4,50%)
3	SUL, GEN, TET	3	2 (9,09%)
4	SUL, TET, CFO	3	2 (9,09%)

\* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência; Número de cepas (%) \*\* = número de cepas com perfil de resistência e porcentagem em relação ao total de 22 cepas; CLO = cloranfenicol; TET = Tetraciclina, ERI = eritromicina; SUL = Sulfonamida; GEN = Gentamicina; CFO = ceftioxina

Existe um reconhecimento crescente de que o uso indiscriminado de antibióticos em animais produtores de alimentos pode contribuir para o

desenvolvimento de resistência a antibióticos comumente usados na medicina humana (WHO, 2017). A União Europeia tem feito esforços substanciais para reduzir o uso geral de antibióticos em animais produtores de alimentos, através da criação de metas nacionais de redução, implementação de medidas de proibição de medicamentos antimicrobianos na alimentação dos animais e exigindo testes de sensibilidade antes do uso de alguns antibióticos de alta prioridade (EMA and EFSA, 2017). Segundo a revisão sistemática com meta-análise realizada por TANG et al. (2017) as intervenções que restringem o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos estão associadas a uma redução na presença de bactérias resistentes aos antibióticos nesses animais.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo mostraram que das sete amostras analisadas, todas as amostras (100%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que seis amostras (85,7%) excederam o limite permitido para *S. aureus* e três amostras (42,7%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes além de uma amostra ter *Salmonella spp.* Portanto, os Queijos Minas frescais comercializado nas feiras permanentes do Distrito Federal apresentaram falta de qualidade microbiológica, sugerindo deficiências no processamento, armazenamento e comercialização e representando perigo à saúde humana. A presença de multirresistência a antimicrobianos nas cepas de *E. coli* e *S. aureus* recuperadas desses queijos mostra que esse alimento pode ser considerado um veículo para a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos, o que é motivo de grande preocupação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

Barbosa DB, et al. Qualidade microbiológica da água dos bebedouros de um Campus universitário de Ipatinga, Minas Gerais. **NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga, v. 3, n. 5, p. 505-517, ago./dez. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, Nº 26, de 09 de julho de 2009. **Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário**. Diário Oficial da União, DF, 10 jul. 2009, Seção 1, p. 14.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União.

BrCAST/EUCAST, 2019, **Manual de Antibiograma 2019 segundo BrCAST/EUCAST**.

BROOKS, J. P.; ADELI, A.; MCLAUGHLIN, M. R. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. **Water Research**, v. 57, p. 96–103, 2014.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne.

EMA and EFSA, European Medicines Agency and European Food Safety Authority. EMA and EFSA joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety. **EFSA Journal**, v. 15, p. 1–245, 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p. 55 – 67, 2016.

FERNANDES, L. L.; GOIS, R. V. Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltadas para a detecção de coliformes totais e termotolerantes, **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, p. 49-64, jul-dez, 2015.

FERREIRA, H; LIMA, H; COELHO, T. Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal. **Portal UFERSA**. 2014. Texto para Discussão.

FLÓREZ, A. B.; ALEGRÍA, Á.; ROSSI, F.; DELGADO, S.; FELIS, G.E.; TORRIANI, S.; MAYO, B. Molecular identification and quantification of tetracycline and erythromycin resistance genes in Spanish and Italian retail cheeses. **BioMed Research International**, 2014.

FONTES, C. O.; SILVA, V. L.; DE PAIVA, M. R.; GARCIA, R. A.; RESENDE, J. A.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; DINIZ, C. G.; Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA*-encoding coagulase-negative



*Staphylococci* isolated from soft cheese in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. 594–599, 2013.

GARCIA, J.K.S.; PRATES, R.P.; FARIAS, P.K.S.; GONÇALVES, S.F.; SOUZA, C. N. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.58–65, 2016.

GOMROKI, F.; MOHAMMED, H. B.; MALLA, S. Amplification of methicillin resistant gene (*mecA*) gene from the MRSA strains. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 3, p. 198-203, 2015.

ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431p.

MARTINI, C. L. et al. Characterization of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 202–205, 2017.

MOMTAZ, H. et al. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 231-342, 2012.

NORNBERG, M. L. B. F.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrótróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n.2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, D.T.; MOREIRA, A.; URNAU, L.; NOSKOSKI, L.; CERESER, N. D. Psicrótróficos na indústria de laticínios. **XV Amostra de Iniciação Científica. UNICRUZ**, RS. 2012.

OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 2, p. 226–232, 11 fev. 2018.

PEXARA, A. et al. Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw ovine and caprine milk in Greece. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 345–357, 2016.

SALEH, M.M.; VARGAS, D.F.M.; BASTOS, I.S.; BAPTISTA, R.F.; COSTA, A.P, KASNOWSKI, M.C.; FRANCO, R.M. Avaliação microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Duque de Caxias/RJ. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.13, n.1, p. 78-88, 2019.

SILVA, C. R. **Marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas de queijo minas frescal**, Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

SOUZA, I.A.; GIOVANNETTI, A.C.S.; SANTOS, L.G.F.; GANDRA, S.O.S.; MARTINS, M.L.; RAMOS, A.L.S. Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado na Zona da Mata Mineira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017.

TANG, K. L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. e316–e327, 2017.

VIEIRA, V. A. et al. Práticas de uso de antimicrobianos em rebanhos bovinos de unidades de agricultura familiar no Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2016.

YAMANAKA, E. H. U.; COGO, L. L.; DALZOTO, P. R.; PIMENTEL, I. C. Microbiological quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 75, p. 1-9, 2016.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

AHMADI, M.; ROHANI, S.M.R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010.

AMORIM, A. L. B.; COUTO, E. P.; SANTANA, A. P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.4, p.364–367, 2014.

AMORIN, A. L. B. **Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo Minas Padrão de fabricação industrial, artesanal e informal**. 2013. 53 p. Monografia – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, 2010.

APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BENOIT, S. R. Community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n.8. p. 1216-1222, 2008.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; MACHADO, T. F. **Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010. 26 p.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352/97 de 04 de setembro de 1997. **Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 4 set. 1997.

BrCAST. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão** EUCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. v. 5. 2016.

CHAPAVAL, L. et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2010.

COSTA, A. R. F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p. 77-84, 2010.

DE MEDEIROS, N. X. de et al. **Detecção molecular de *Salmonella* sp. em amostras avícolas**. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações UFG, 2013. Dissertação de Mestrado.

DIAS, N.; SILVA, D.; OLIVEIRA, D.; FONSECA, J. A.; SALES, M.; SILVA, N. Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.1547-1552, 2011.

DIEDRICH, C.; POZZOBON, A.; KICH, D.M.; AGOSTINI, C.; BUSTAMANTE FILHO, I.C.; SOUZA, C.F.V. Detecção de *S. aureus* em amostras de leite cru. **Alimentos e Nutrição**, v.24, n.3, p. 291-296, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p. 55 – 67, 2016.

FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, n. 5, 2011.

FRANÇA, M. S. S. **Resistência bacteriana em bacilos Gram-negativos: a importância dos testes fenotípicos**. Biblioteca Digital de Monografias UFRN, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso.

GARCIA, J.K.S.; PRATES, R.P.; FARIAS, P.K.S.; GONÇALVES, S.F.; SOUZA, C. N. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.58–65, 2016.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GONÇALVES, J. S. et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica PCR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. C. V.; AZEVÊDO, P. F.; MENESES, R. B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259-265, 2012.

HENRIQUE, W. N. et al. **Resistência bacteriana**. Faculdade Alfredo Nasser, 2012. Anais de evento.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

INSA. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2010). **Resistência aos antimicrobianos**.

KOMATSU R. S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010

LABORCLIN. **Manual Para Antibiograma: difusão em disco (Kirby e Bauer)**. 2011. Disponível em: [http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\\_190.pdf](http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf)

MICHAEL, G. B. et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 427-443, 2015.

MOORE, J.; GROSS, E. A. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n.1, p. 47-49, 2010.

PANKEY, G., SABATH L. Clinical relevance of bacteriostatic *versus* bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. **Oxford Journal**, v. 38, p. 864-865, 2013.

PASSOS, A.D.; FERREIRA, G.K.L.; JULIANI, G.L.; SANTANA, E.H.W.; ALEGRO, L.C.A. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Araçatuba e Londrina – PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.64, n.369, p.48-54, 2009.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.

PINTO, F. G. S. et al., Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijos minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38-46, 2010.

SCHEIDEGGER, E. M. D. **Identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas de queijo tipo minas frescal através da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição de parte do gene 16s rRNA amplificado pela PCR**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

SILVA, L. M. **Perfil microbiológico de queijo minas frescal industrializado e artesanal comercializado em Goiânia, Goiás**, Tese (Mestrado), UFG, 982 p., 2015.

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 50 p.

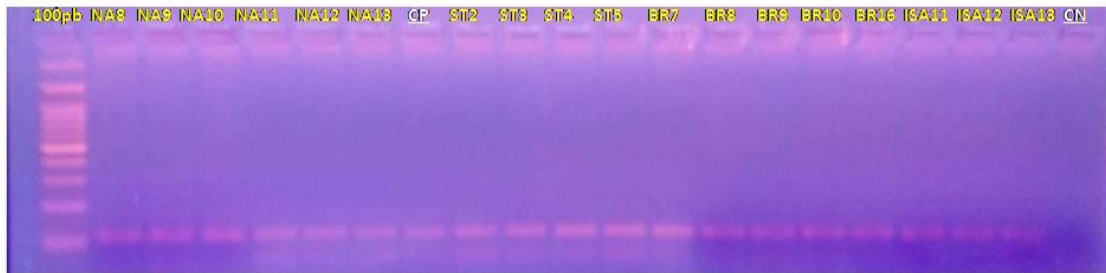
TOHIDPOUR, A. *et al.* Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.

VISOTTO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; PRADO, S. P. T.; BERGAMINI, A. M. M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.



ZOCHE F., SILVA, W. P. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 187-193, 2012.

## 7. ANEXOS



Anexo 7.1 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *MalB* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; BR7 a BR10 = amostras deste estudo com amplicons de *MalB* (113 pb); ST2 a ST5; NA8 a NA13 e ISA11 a ISA 13 = controles internos do laboratório, CP= Controle positivo *E. coli* ATCC 29213; CN = Controle Negativo.



Anexo 7.2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *nuc* de *S. aureus*; 100pb = marcador de 100 pb; BR4 a BR6 = amostras deste estudo com amplicons de *nuc* (105 pb); ISA2 a ISA10 e A2 a A7= controles internos do laboratório; CP= controle positivo de *S. aureus* ATCC 33862

**Anexo 7.3 - Antibiograma das bactérias *E. coli* isoladas das amostras das amostras de queijos Minas frescas informais**

CEPAS	BR7	BR16	BR17	BR18	BR19	BR20	BR21	A7.1	A7.2	A7.3	A7.4	A7.5
<b>SUL</b>	32	25	30	SH	32	32	37	SH	SH	12	SH	SH
<b>CLO</b>	30	29	26	28	21	29	25	25	22	31	26	24
<b>CTX</b>	31	35	25	33	40	36	40	33	SH	31	36	26
<b>TET</b>	30	30	26	21	30	24	29	22	SH	27	SH	SH
<b>IMP</b>	32	35	31	36	33	30	34	32	21	28	36	31
<b>GEN</b>	22	21	22	21	23	20	24	23	11	20	11	18
<b>AMC</b>	26	25	25	26	31	27	27	21	25	28	SH	SH
<b>CIP</b>	31	35	32	32	33	31	34	30	24	32	21	33
<b>CAZ</b>	28	31	30	31	32	31	29	31	SH	32	30	29

Halos medidos em mm; SH = sem halo de inibição; SUL = sulfonamida, CLO = cloranfenicol, CTX = cefotaxima, TET = tetraciclina, IMP = imipenem, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, CAZ = ceftazidima.

Sensível, Intermediário, Resistente

**Anexo 7.4 - Antibiograma das bactérias *S. aureus* isoladas das amostras das amostras de queijos Minas frescais informais**

CEPAS	BR11	BR12	BR15	BR17	BR22	BR23	BR24	BR25	BR26	BR27	B1.1	B1.2	B1.4	B1.8	B1.10	B2.1	B2.2	B2.3	B2.4	B2.5	B2.6	B2.7
<b>SUL</b>	SH	SH	SH	29	14	20	SH	SH	22	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
<b>CLO</b>	30	27	40	10	15	15	34	30	20	21	25	10	26	25	21	25	23	23	23	23	23	29
<b>CFO</b>	33	30	SH	27	30	29	29	35	30	26	32	29	24	25	27	27	25	27	25	30	20	13
<b>TET</b>	28	25	32	SH	30	30	29	30	25	30	SH	SH	11	23	SH	9	9	11	8	30	SH	28
<b>ERI</b>	26	26	20	SH	10	28	35	30	30	30	25	30	23	24	23	25	22	25	22	28	28	25
<b>GEN</b>	27	30	30	30	27	24	26	25	23	18	SH	24	19	21	17	8	22	19	23	23	18	19
<b>AMC</b>	36	36	SH	38	29	31	33	32	32	31	37	33	25	27	28	32	30	29	34	35	25	31
<b>CIP</b>	25	23	25	30	23	29	30	35	31	15	24	24	20	21	23	25	23	20	27	29	21	22
<b>VAN</b>	19	14	28	20	SH	20	23	20	15	15	17	20	16	16	16	18	16	16	18	19	19	16

Halos medidos em mm; SH = sem halo de inibição; SUL = sulfonamida, CLO = cloranfenicol, CFO = cefoxitina, TET = tetraciclina, ERI = eritromicina, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, VAN = vancomicina.

Sensível, Intermediário, Resistente

## **ANEXO 7.5. Normas de submissão para a revista Higiene Alimentar**

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point* ou *Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do programa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e coautores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados.

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e coautores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br).

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-

*mail* [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via *e-mail*.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail* [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)