

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS**

Jéssica Schaeffer Nogueira

**Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos
Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e
ingredientes utilizados na sua produção**

Juiz de Fora
2022

Jéssica Schaeffer Nogueira

Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua produção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Christine Lange

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nogueira, Jéssica Schaeffer.

Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua produção / Jéssica Schaeffer Nogueira. -- 2022.

62 p. : il.

Orientador: Carla Christine Lange

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2022.

1. gene *mecA*. 2. Kocuria. 3. *Micrococcus*. 4. queijos artesanais. 5. *Staphylococcus*. I. Lange, Carla Christine, orient. II. Título.

Jéssica Schaeffer Nogueira

Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua produção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 31 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Christine Lange - Orientadora
Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Fabíola Fonseca Ângelo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Edna Froeder Arcuri
Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, 18/08/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Carla Christine Lange, Usuário Externo**, em 02/09/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edna Froeder Arcuri, Usuário Externo**, em 05/09/2022, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola Fonseca Angelo, Coordenador(a)**, em 13/09/2022, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.ufff.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0913811** e o código CRC **055C3C7A**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo, especialmente minha mãe, Patricia, que sempre me mostrou a importância dos estudos e da educação.

Muito obrigada, Charles, por ser o meu maior exemplo de determinação e dedicação aos estudos. Obrigada também por sempre me dizer que no final tudo daria certo.

Poucos mestrandos tiveram a sorte de serem orientados por alguém tão paciente, organizado, competente e compreensivo. Muito obrigada, Carla, por ser um exemplo de profissional que levarei pra vida toda.

Agradeço à Embrapa Gado de Leite, especialmente à equipe do Laboratório de Microbiologia do Leite (Marcos e Cláudia) que sempre se dispuseram a me auxiliar e ensinar. Agradeço imensamente à Alessandra, por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiência.

À professora Dr^a. Márcia Giambiagi de Marval, pela parceria no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ) para a identificação dos isolados e também à servidora Larissa, pela assistência nas análises.

Meus agradecimentos aos professores da Embrapa Gado e Leite, Universidade Federal de Juiz de Fora e do Instituto de Laticínios Cândido Tostes pelos ensinamentos.

RESUMO

O consumo de queijos artesanais produzidos com leite cru vem crescendo no Brasil, e novas regiões produtoras vêm se estabelecendo e ganhando destaque. A produção e o consumo desses queijos representam uma fonte de disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e de genes de resistência. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resistência de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e de queijos artesanais produzidos em dois municípios da região sul/sudeste do Estado de Minas Gerais. O isolamento dos microrganismos foi feito a partir do ágar Baird-Parker durante procedimento de pesquisa e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de alimentos. A identificação bacteriana foi feita pela técnica de MALDI-TOF MS e o perfil de resistência foi determinado pela técnica de difusão em ágar. A pesquisa do gene *mecA* foi feita pela técnica de PCR. Foram identificados 82 cocos Gram-positivos catalase positivos pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* (n=75), *Kocuria* (n=3) e *Macrococcus* (n=4). Destas amostras, 79,3% apresentaram resistência a algum antimicrobiano e 17,1% apresentaram multirresistência (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos). O antimicrobiano com maior percentual de resistência foi a penicilina (67,1%), seguido pela tetraciclina (42,7%) e pelas sulfonamidas (26,8%). O gene *mecA* foi detectado em três isolados, um *S. aureus*, um *S. epidermidis* e um *S. haemolyticus*. A ocorrência de estirpes de *Staphylococcus* multirresistentes aos antimicrobianos e a presença do gene *mecA* em três dessas estirpes ressaltam a importância da vigilância sobre a qualidade microbiológica do leite cru e dos queijos artesanais produzidos em Minas Gerais.

Palavras-chave: gene *mecA*; *Kocuria*; *Macrococcus*; queijos artesanais; resistência aos antimicrobianos; *Staphylococcus*

ABSTRACT

The consumption of artisanal cheeses produced with raw milk is growing in Brazil, and new producing regions have been establishing themselves and gaining prominence. The production and consumption of these cheeses represent a source of dissemination of antimicrobial-resistant bacteria and of resistance genes. The aim of this study was to evaluate the resistance profile of species belonging to the genus *Staphylococcus* isolated from raw milk, whey, brine and artisanal cheeses produced in two municipalities in the south/southeast region of the State of Minas Gerais. Isolation of the microorganisms was made from Baird-Parker agar during the enumeration of coagulase-positive staphylococci from food samples. Bacterial identification was performed using MALDI-TOF mass spectrometry and the resistance profile was determined using the agar diffusion technique. The search for the *mecA* gene was performed using PCR. Eighty-two catalase-positive Gram-positive cocci belonging to the genera *Staphylococcus* (n=75), *Kocuria* (n=3) and *Macrococcus* (n=4) were identified. Of these samples, 79.3% showed resistance to at least one antimicrobial and 17.1% showed multidrug resistance (resistance to three or more classes of antimicrobials). The antimicrobial with the highest percentage of resistance was penicillin (67.1%), followed by tetracycline (42.7%) and sulfonamides (26.8%). The *mecA* gene was detected in three isolates, one *S. aureus*, one *S. epidermidis* and one *S. haemolyticus*. The occurrence of multiresistant *Staphylococcus* strains and the presence of *mecA* gene in three of these strains underscore the importance of monitoring the microbiological quality of raw milk and artisanal cheeses produced in Minas Gerais.

Key-words: antimicrobial resistance; artisanal cheese; *Kocuria*; *Macrococcus*; *mecA* gene; *Staphylococcus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração esquemática da estrutura do SCC <i>mec</i>	22
Figura 2 - Esquema da expressão da forma alterada da proteína de ligação à penicilina PBP2, chamada PBP2a, com afinidade de ligação reduzida à β -lactâmicos.....	23
Figura 3 - Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar.....	39
Quadro 1- Número e percentagem de estirpes do gênero <i>Staphylococcus</i> isoladas de queijos artesanais, leite cru, soro-fermento e salmoura, resistentes a diferentes antimicrobianos.....	42
Quadro 2 - Fenótipo de resistência apresentado por espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas de queijos artesanais, leite cru, soro-fermento e salmoura	43
Figura 4 - Fotografia da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 533 pb do gene <i>mecA</i> detectados em <i>Staphylococcus</i> spp., isolados de leite cru e salmoura...	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar.....	33
Tabela 2 - Espécies de cocos Gram-positivos catalase positivos isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e queijos artesanais.....	37
Tabela 3 - Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene <i>mecA</i> em estirpes de <i>Staphylococcus</i> , <i>Kocuria</i> e <i>Macrococcus</i> isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e de queijos artesanais.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
β	Beta
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
BPF	Boas Práticas de Fabricação
°C	Graus Celsius
CA-MRSA	<i>Community Associated</i> MRSA (MRSA Associado à Comunidade)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
DTHAs	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HA-MRSA	<i>Hospital Associated</i> MRSA (MRSA associado à Hospitais)
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
LA-MRSA	<i>Livestock Associated</i> MRSA (MRSA Associado à Pecuária)
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz/tempo de voo)
mg	Miligrama
MH	Mueller-Hinton
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Micromolar
MRSA	Meticillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina)

NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanometro
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PBP2A	<i>Penicillin Binding Protein 2A</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pMol	Picomolar
rpm	Rotações por Minuto
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEAPA	Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
seg	Segundos
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
µg	Micrograma
µl	Microlitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
% v/v	Porcentagem volume-volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	17
3.1.1	Doenças causadas por <i>Staphylococcus</i>	17
3.1.2	Resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. aos antimicrobianos	20
3.2	GÊNERO <i>Micrococcus</i>	25
3.3	GÊNERO <i>Kocuria</i>	26
3.4	QUEIJOS ARTESANAIS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	SOLAMENTO DE <i>Staphylococcus</i> e ESTOQUES DE TRABALHO.....	31
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES POR MALDI-TOF MS.....	31
4.2.1	Preparação das amostras bacterianas	32
4.4.2	Obtenção dos dados espectrais e interpretação dos resultado	32
4.3	DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	33
4.4	PESQUISA DO GENE <i>mecA</i>	35
4.4.1	Extração do DNA	35
4.4.2	Amplificação do gene <i>mecA</i>	36
5	RESULTADOS	37
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES.....	37
5.2	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	39
5.3	PRESENÇA DO GENE <i>mecA</i>	44
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE A.....	61

1 INTRODUÇÃO

A utilização de antibióticos abriu caminho para avanços sociais e terapêuticos importantes, tornando-se indispensável em todos os sistemas de saúde. Procedimentos médicos como tratamento quimioterápico contra o câncer, transplante de órgãos, cirurgias, e a cura para diversas doenças não seria possível sem a utilização dos antimicrobianos. Contudo, é cada vez mais necessário o desenvolvimento de outras drogas mais potentes para combater bactérias resistentes e, futuramente, o panorama global da resistência antimicrobiana poderá acarretar sérias consequências sociais e econômicas (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

O uso desses fármacos em hospitais, pela comunidade, e na agricultura e pecuária muitas vezes se dá de forma intensa e indiscriminada, levando à seleção de bactérias resistentes. A administração de antibióticos em baixos níveis para promover o crescimento na criação de animais vem sendo praticada há anos. Isso explica o fato da pecuária ser um dos setores mais relacionados historicamente como uma das vias mais comuns de disseminação de bactérias resistentes a antibióticos.

Uma outra fonte importante de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos é a cadeia de alimentos. Espécies de *Staphylococcus* são comumente encontradas no leite e seus derivados, podendo também causar toxinfecções alimentares, além de poderem disseminar genes de resistência a drogas antimicrobianas. A ingestão de alimentos de origem animal contaminados pode levar a transmissão de bactérias resistentes.

A ocorrência de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRSA) relatada em *Staphylococcus* isolados de leite de vacas com mastite e de queijos causa preocupação, dada a possibilidade de transferência dos genes de resistência para outras bactérias (DORNELES *et al.*, 2018). O consumo de queijos artesanais produzidos com leite cru vem crescendo, e novas regiões produtoras vêm se estabelecendo e ganhando destaque. A produção e o consumo desses queijos também representam uma fonte de disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e de genes de resistência, como o gene *mecA*.

Considerando as altas taxas de contaminação de leite e queijos por bactérias do gênero *Staphylococcus* e a possibilidade de transferência de genes de resistência de bactérias do alimento para a microbiota humana, este estudo teve como objetivo estabelecer o fenótipo de resistência de espécies do gênero *Staphylococcus* isoladas de leite cru e de queijos artesanais no Estado de Minas Gerais, bem como verificar a ocorrência do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, nas estirpes analisadas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar o perfil de resistência de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isoladas de leite cru e queijos artesanais produzidos em municípios da região sul/sudeste do Estado de Minas Gerais.

Objetivos específicos:

1. Identificar as estirpes selecionadas em nível de espécie pela técnica de MALDI-TOF MS.
2. Determinar o perfil de resistência das estirpes pela técnica de difusão em ágar com discos de antibióticos.
3. Pesquisar a presença do gene *mecA* através de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR), nas estirpes selecionadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *Staphylococcus*

Staphylococcus são bactérias em forma de cocos, Gram-positivas, catalase positivas, não esporuladas, com diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5 µm. Organizam-se em pares, pequenas cadeias ou em forma de cacho de uva. São bactérias anaeróbias facultativas, apresentam metabolismo respiratório, contudo, também podem se desenvolver de forma fermentativa. Podem ser identificadas pela morfologia de suas colônias, padrão de hemólise e perfil bioquímico. São catalase positivas, o que permite a sua distinção dos *Streptococcus* e de outros gêneros de bactérias (FORSYTHE, 2013; QUINN *et al.*, 2019).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, e é atualmente composto por 63 espécies amplamente distribuídas no meio ambiente. Esses microrganismos podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a capacidade de produzir coagulase: *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Entre as espécies pertencentes aos SCP, estão *S. aureus*, *S. intermedius* e algumas estirpes de *S. hyicus* e *S. agnetis*. A grande maioria das espécies de *Staphylococcus*, entretanto, são coagulase negativas (LPSN, 2022a).

Espécies do gênero *Staphylococcus* são relativamente resistentes à atividade de água reduzida, sendo tolerantes ao ressecamento e a altas concentrações de sal (NaCl). A capacidade de se desenvolver em meios salinos favorece seu isolamento seletivo. Por exemplo, se um inóculo for semeado em uma placa de meio sólido rico contendo 7,5% de NaCl e incubado em condições aeróbias, os cocos Gram-positivos geralmente formam as colônias predominantes. Algumas espécies são pigmentadas, o que também contribui para a identificação de microrganismos desse gênero (MADIGAN *et al.*, 2016).

3.1.1 Doenças causadas por *Staphylococcus*

Os estafilococos são comensais e parasitas comuns de seres humanos e animais, e por vezes são causadores de infecções graves. Duas espécies têm maior importância para o homem: *Staphylococcus epidermidis*, que na maioria das vezes é encontrada na pele ou nas membranas mucosas, e *Staphylococcus aureus*. Ambas têm potencial patogênico, mas *S. aureus* é mais comumente associado a patologias como furúnculos, acne, pneumonia, osteomielite, meningite e artrite, entre outras. Grande parte das infecções estafilocócicas são decorrentes do contágio de bactérias presentes na microbiota normal de um indivíduo infectado, contudo assintomático, a um indivíduo suscetível (JAY *et al.*, 2005; FORSYTHE, 2013; MADIGAN *et al.*, 2016).

Espécies de SCN também estão presentes principalmente na pele e nas mucosas de seres humanos e animais, logo estão sempre em um relacionamento muito próximo e simbiótico com seus hospedeiros. Apesar das espécies de estafilococos mais relacionadas como patogênicas serem coagulase positivas, os SCN são microrganismos oportunistas que causam infecções em indivíduos vulneráveis. O número de indivíduos suscetíveis a infecções por SCN vem crescendo. Houve aumento no número de recém-nascidos prematuros, idosos, pacientes cronicamente doentes e, muitas vezes, imunocomprometidos, bem como o aumento do uso de dispositivos inseridos em procedimentos, terapias ou cirurgias, levando a uma grande variedade de infecções causadas por SCN. Conseqüentemente, esses microrganismos tornaram-se importantes patógenos, apesar das alterações inflamatórias geralmente serem subagudas. Apresentam importância clínica devido a dificuldades de tratamento, e a sua resistência aos antibióticos vem sendo cada vez mais estudada (BECKER *et al.*, 2014).

Staphylococcus spp. são disseminados com facilidade através das partículas de poeira presentes no ar e nas superfícies, contudo, a fonte mais importante para contaminação dos alimentos são os portadores. Portadores são indivíduos cujas mãos e braços apresentam feridas e furúnculos contaminados, ou fossas nasais colonizadas com a bactéria, e que manipulam alimentos. Critérios de controle microbiológico devem ser aplicados na cadeia de alimentos, associados a programas de controles, tais como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPF), para reduzir a contaminação dos alimentos (JAY *et al.*, 2005; MADIGAN *et al.*, 2016).

Na Turquia, Guven *et al.* (2010) analisaram 413 amostras de produtos de origem animal, como leite cru, manteiga, queijos e outros derivados, e também carne bovina, de aves e produtos cárneos. Dentre todas as amostras, 33,4% estavam contaminadas com *S. aureus*. Com relação aos produtos lácteos, das 259 amostras analisadas, 23,2% apresentaram esse microrganismo. Jamali *et al.* (2015), ao analisarem 2.650 amostras de leite cru e de produtos lácteos tradicionais do Irã, encontraram *S. aureus* em 328 (12,4%) amostras. Tais estudos demonstram a importância da vigilância sobre a ocorrência de *S. aureus* em produtos de origem animal.

Intoxicações alimentares podem ocorrer após a ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas por *Staphylococcus*. Ao serem ingeridas, as toxinas passam pelo estômago até o intestino delgado, local onde desencadeiam os sintomas da doença: náuseas, vômitos, diarreia e desidratação, principalmente. O início do quadro é rápido, de uma a seis horas após a ingestão do alimento, dependendo da quantidade de toxina ingerida, mas os sintomas geralmente regridem em menos de 48 horas. Assim como outras doenças de origem alimentar, a intoxicação por estafilococos pode ser impedida por meio de medidas de saneamento e higiene adequadas na produção, no preparo e no armazenamento dos alimentos (JAY *et al.*, 2005; MADIGAN *et al.*, 2016).

No Brasil, o perfil de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), como a intoxicação por toxinas estafilocócicas, ainda não é bem conhecido. Somente alguns Estados e Municípios dispõem de dados sobre a incidência, agentes etiológicos, alimentos mais frequentemente associados e população de maior risco. Contudo, se sabe que a incidência pode variar em relação a diversos aspectos, como educação, condições socioeconômicas, saneamento, fatores ambientais e culturais. Em geral, a mortalidade por DTAs é baixa, depende das condições do paciente, porém menores de cinco anos, imunodeprimidos e idosos apresentam mortalidade elevada. No período de 2007 a 2020, foram notificados, por ano, em média 662 surtos de DTHAs (doenças de transmissão hídrica e alimentar), com o envolvimento de 156.691 doentes (média de 17 doentes/surto), 22.205 hospitalizados e 152 óbitos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2022).

Uma das principais doenças que acomete o bovino leiteiro é a mastite, que é a inflamação da glândula mamária, geralmente causada por microrganismos, sendo as

bactérias os agentes causais mais comuns. A doença pode se apresentar de forma clínica ou subclínica, e aguda ou crônica. Na mastite clínica é possível observar alterações na glândula mamária (sinais de inflamação) e no leite (presença de grumos), e geralmente ocorre de forma aguda. Já na mastite subclínica, não se observam alterações na glândula mamária, nem alterações macroscópicas no leite, e ocorre de forma crônica no rebanho (KHAN, 2013; QUINN *et al.*, 2019).

A mastite bovina causada por *S. aureus* é comum e de ocorrência mundial. A transmissão do patógeno ocorre principalmente no momento da ordenha, através do contato com as mãos do ordenhador, com a ordenhadeira, e panos e toalhas destinados à limpeza do úbere, sendo considerada uma mastite contagiosa. Casos crônicos e subclínicos são mais comuns, e a bactéria é eliminada no leite dos quartos afetados de forma intermitente. Concomitantemente ocorre aumento na contagem de células somáticas e queda na produção leiteira. O principal reservatório da mastite estafilocócica é a glândula mamária infectada, sendo assim, a disseminação de *S. aureus* em rebanhos leiteiros preocupa não apenas por sua elevada virulência, mas também devido à dificuldade de se criar medidas preventivas eficazes (ACOSTA *et al.*, 2016; QUINN *et al.*, 2019).

A mastite em bovinos também pode ser causada por SCN, que são agentes oportunistas da pele do teto. Por serem habitantes da pele, podem invadir a glândula mamária e ocasionar infecções leves, geralmente subclínicas (SANTOS; FONSECA, 2007).

Em um estudo que envolveu dez propriedades leiteiras no estado de São Paulo, dos 722 agentes etiológicos de mastite bovina encontrados, 263 eram *Staphylococcus* spp.: 51,3% SCP e 48,7% SCN (LANGONI *et al.*, 2015).

Picoli *et al.* (2014) identificaram microrganismos presentes no leite obtido de tanques de expansão de 274 propriedades da região sul do Rio Grande do Sul. Todas as 822 amostras de leite cru coletadas apresentaram crescimento de colônias características de *Staphylococcus* spp. Estes autores também observaram que a ordenha manual, a não realização do pré-dipping (desinfecção do teto antes da ordenha), a forma como é realizada a secagem do teto (uso de papel ou toalha de pano) e as instalações da sala de ordenha foram os fatores que mais influenciam na ocorrência de agentes infecciosos no leite. Dessa forma, concluíram que as boas práticas de ordenha são fundamentais para o controle e a prevenção da mastite causada por *Staphylococcus* spp.

3.1.2 Resistência de *Staphylococcus* aos antimicrobianos

Alexander Fleming em 1929, após deixar placas contendo culturas de *Staphylococcus* spp. expostas ao ar em sua mesa, observou contaminação das placas por vários microrganismos. Percebeu que, em torno de uma grande colônia fúngica, as colônias de estafilococos se tornaram transparentes e estavam lisadas. Descobriu assim que substâncias produzidas por cepas de *Penicillium* tinham propriedades inibitórias sobre bactérias patogênicas (FLEMING, 1929). Tal descoberta foi o pontapé inicial para o desenvolvimento dos antimicrobianos.

Entretanto, já na década de 1950, as cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina eram tão comuns que a penicilina estava se tornando inútil contra infecções estafilocócicas. A introdução da meticilina, a primeira das penicilinas semissintéticas, na prática clínica em 1959 e 1960, resolveu esse problema, pelo menos por um tempo (CHAMBERS, 1988).

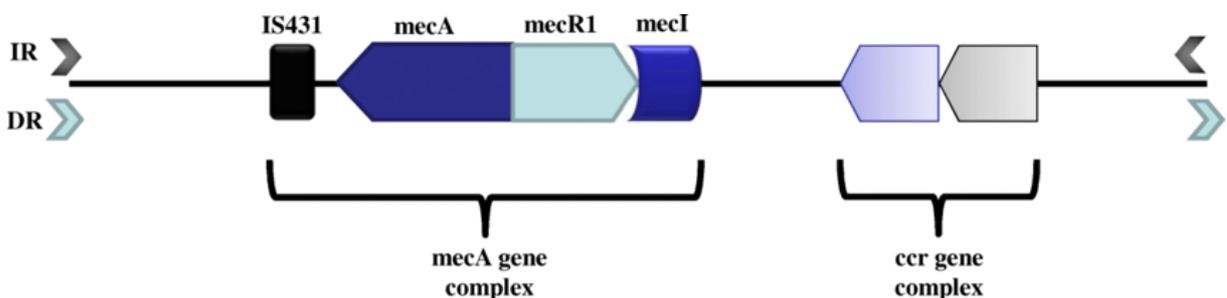
A resistência aos antimicrobianos surge como consequência de mutações na bactéria, e através de seleção pelo uso de antibióticos, que fornece uma vantagem competitiva para cepas mutadas. A administração de doses de antibióticos inferiores às recomendadas também ajuda na seleção gradual de microrganismos resistentes (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). Assim, a disseminação da resistência das bactérias aos antimicrobianos, é, em parte, uma consequência natural da pressão seletiva resultante do uso clínico dos antimicrobianos no tratamento das infecções bacterianas e como promotores de crescimento de animais de interesse pecuário (BASTOS, 2007).

Em *Staphylococcus* é comum a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Os antibióticos desse grupo são assim denominados por possuírem em sua estrutura um anel β -lactâmico, e fazem parte deste grupo as penicilinas naturais e semissintéticas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e as carbapenemas. As células de *Staphylococcus* produzem normalmente quatro tipos de proteínas transpeptidase ligadas à membrana chamadas *penicillin-binding protein*, proteínas ligantes à penicilina em português (PBPs 1-4). Essas proteínas mediam reações de transpeptidação e carboxipeptidação, importantes para a ligação cruzada do esqueleto peptidoglicano na parede celular bacteriana. Quando a célula bacteriana é

incapaz de sintetizar corretamente a parede celular devido à ligação das PBPs pelo antimicrobiano, ocorre a inibição da divisão celular (efeito bacteriostático) ou morte celular (efeito bactericida) (MARANAN *et al.*, 1997; MURPHY *et al.*, 2011).

A meticilina é uma penicilina semissintética resistente à ação de β -lactamases. A resistência à meticilina, que se manifesta em estirpes de *Staphylococcus* deve-se à presença no cromossomo bacteriano de um locus genético chamado SCCmec (cassete cromossômico estafilocócico). O SCCmec (Figura 1) é composto por três elementos principais: o complexo do gene *mec* que codifica a resistência à meticilina/oxacilina, o complexo do gene *ccr*, que codifica recombinases responsáveis pela sua motilidade e as regiões de junção (ou J). O complexo do gene *mec* compreende o gene *mecA* e, quando presente, seus genes reguladores, *mecI* (um repressor) e *mecR1* (indutor), bem como uma sequência de inserção IS431*mec* (BECKER *et al.*, 2014; GILL *et al.*, 2019)

Figura 1 – Ilustração esquemática da estrutura do SCCmec



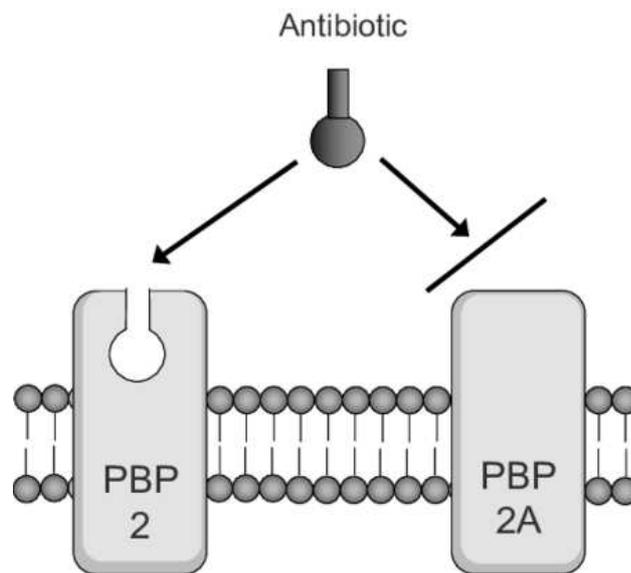
IR, inverted repeat (repetição invertida); DR, direct repeat (repetição direta)

Fonte: Gill *et al.* (2019).

O gene *mecA* codifica a síntese de uma PBP alterada chamada PBP2A (*penicillin binding protein 2A*, ou proteína ligante à penicilina 2A). A PBP2A possui uma menor afinidade pela maioria dos antibióticos β -lactâmicos, e por isso não se liga a estas drogas (Figura 2). Consequentemente, uma bactéria resistente à meticilina apresenta resistência cruzada a outras drogas β -lactâmicas, incluindo as cefalosporinas (KUWAHARA-ARA *et al.*, 1996; BASTOS, 2007; BECKER *et al.*, 2014).

Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina vêm sendo identificadas por meio de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), através da pesquisa do gene *mecA* (SOUZA *et al.*, 2005). Esta técnica complementa os métodos fenotípicos, oferece eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível.

Figura 2 – Esquema da expressão da forma alterada da proteína de ligação à penicilina PBP2, chamada PBP2a, com afinidade de ligação reduzida à β -lactâmicos



Fonte: Murphy *et al.* (2011).

S. aureus resistente à meticilina é comumente relacionado a infecções nosocomiais (*Hospital Associated MRSA*, HA-MRSA), mas também está sendo relacionado à comunidade (*Community Associated MRSA*, CA-MRSA), causando infecções graves. Ainda, a infecção e colonização por MRSA em animais de produção (*Livestock Associated MRSA*, LA-MRSA) também vem sendo documentada. Animais de produção são potenciais reservatórios de MRSA, que pode ser introduzido na comunidade por meio do consumo de alimentos de origem animal (KLUYTMANS, 2009; SPANU *et al.*, 2014; TEGEGNE *et al.*, 2019).

Loureiro *et al.* (2016) ressaltam a importância de se adotar medidas para se obter um controle maior sobre o consumo de antimicrobianos na prática da Medicina Veterinária e na produção animal. Estas atividades são apontadas como grandes responsáveis pelo uso inadequado de muitos antibióticos, selecionando cepas resistentes. Tais cepas posteriormente podem ser transmitidas para humanos.

Em um estudo envolvendo SCN, 128 isolados foram recuperados de 1.484 amostras de leite obtidas de vacas com mastite, de onze propriedades leiteiras brasileiras. Desses isolados, 20,3% abrigavam o gene *mecA* e mostraram resistência à oxacilina e cefoxitina. Os isolados *mecA* positivos foram identificados como *S. epidermidis* (7), *S. chromogenes* (7), *S. warneri* (6), *S. hyicus* (5) e *S. simulans* (1). Os autores ressaltam a importância de SCN como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e estruturas genéticas antimicrobianas que podem ser transferidas para outras bactérias patogênicas (SILVA *et al.*, 2014b).

Santos *et al.* (2016) encontraram o gene *mecA* em dez cepas de SCN identificadas como *S. epidermidis*, estes isolados foram resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos testados. Tais resultados destacam a importância de se investigar o perfil molecular e fenotípico da resistência antimicrobiana em espécies de estafilococos visando controlar a disseminação da resistência.

Soares *et al.* (2017) avaliaram a resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica em fazendas leiteiras localizadas no Estado do Rio de Janeiro, além da presença do gene *mecA* nestas estirpes. Estes autores encontraram 83,6% de estirpes resistentes à penicilina, mas nenhum isolado apresentou o gene *mecA*. Por outro lado, Guimarães *et al.* (2017) relataram um surto de mastite bovina em um rebanho leiteiro localizado no Estado de São Paulo, causado por uma estirpe de *S. aureus* resistente à metilicina. O gene *mecA* foi detectado em 48,3% dos isolados que causaram o surto.

Dorneles *et al.* (2019) analisaram a resistência aos antibióticos de estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina em Minas Gerais, reportando altas percentagens de resistência à penicilina, tetraciclina e sulfonamidas, e 2,8% de isolados resistentes à oxacilina.

Pereira *et al.* (2009) observaram uma relação entre a resistência a antibióticos em estirpes isoladas de leite cru, e aquelas isoladas de mastite bovina. Os isolados se mostraram mais resistentes à penicilina e à ampicilina, e mais susceptíveis a outros antibióticos. Provavelmente essa resistência seja resultado do uso de β -lactâmicos em tratamentos contra mastite.

Estudos sobre a ocorrência de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos provenientes de produtos de origem animal também são relatados na literatura. Kuchenbecker *et al.* (2009), ao analisar isolados de *S. aureus* oriundos de diferentes produtos de origem animal industrializados, obtidos de quatro regiões geográficas do

País, observaram 64,1% de isolados resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As regiões Sul e Sudeste foram as que apresentaram maiores índices de resistência, podendo este fato ser correlacionado com a maior concentração de produção animal intensiva nestas regiões.

Pereira *et al.* (2009) reportaram 73% de *S. aureus* resistentes à penicilina, isolados de diferentes alimentos em Portugal, incluindo leite cru e queijo, mas não detectaram o gene *mecA* em nenhum isolado. Spanu *et al.* (2014) não detectaram o gene *mecA* em *S. aureus* isolados de queijo de ovelha produzido com leite cru. Silveira Filho *et al.* (2014) também não detectaram *S. aureus* resistentes à meticilina isolados de leite cru e de queijo feito de leite cru, coletados em fazendas da área rural de Pernambuco.

Num estudo realizado na Turquia, com estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, entre estes, leite cru e queijo, Yucel *et al.* (2011) relataram uma percentagem alta de resistência à penicilina (92%), mas uma percentagem bem menor de *S. aureus* resistente à meticilina (2,5%).

Por outro lado, Jamali *et al.* (2015) relataram 16,2% de *S. aureus* resistentes à meticilina isolados de leite cru de vacas e ovelhas, queijos e um iogurte tradicional do Iran, ambos feitos de leite cru. E Al-Ashmawy *et al.* (2016) reportaram elevadas percentagens de resistência à penicilina, cloxacilina, amoxicilina e tetraciclina, e 53% de resistência à meticilina em *S. aureus* isolados de leite cru, queijos, sorvetes e iogurtes comercializados na cidade egípcia de Mansoura.

Fontes *et al.* (2013) determinaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de SCN isolados de queijo Minas comercializados na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Estes autores encontraram uma percentagem alta de resistência nos isolados de SCN analisados, e uma percentagem igualmente alta de isolados positivos para o gene *mecA* (81,5%), o que é um dado preocupante.

Castro *et al.* (2020) avaliaram 76 isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru, de fermento (pingo), de queijo Minas artesanal e de manipuladores de queijo de nove propriedades rurais localizadas no Campo das Vertentes, Minas Gerais. Sessenta e sete por cento dos isolados foram resistentes à penicilina e 27,6% resistentes à tetraciclina, mas nenhum isolado apresentou multirresistência, nem o gene *mecA*.

3.2 GÊNERO *Macrococcus*

Macrocooccus são cocos Gram-positivos, catalase positivos, coagulase negativos e oxidase positivos, e o gênero atualmente engloba 12 espécies. As espécies deste gênero pertenciam anteriormente ao gênero *Staphylococcus*, porém, em 1998 pesquisadores caracterizaram quatro espécies com diferenças significativas do gênero *Staphylococcus* e propuseram a criação do novo gênero *Macrocooccus*. Dadas as semelhanças genéticas entre os dois gêneros, a identificação pode ser um problema. Em métodos tradicionais de identificação, macrococos muitas vezes são identificados como estafilococos (SCHLEIFER *et al.*, 1982; KLOOS *et al.*, 1998; JAY *et al.*, 2005; LPSN, 2022b).

Macrocooccus estão presentes naturalmente na microbiota de vários animais, por isso alimentos de origem animal como leite e queijos podem ser contaminados com esse microrganismo. *Macrocooccus caseolyticus* é a espécie de maior relevância em relação à contaminação de alimentos, e causa preocupação devido a sua capacidade de resistência a antibióticos, incluindo resistência à meticilina (KLOOS *et al.*, 1998; MACFADYEN *et al.*, 2018).

A presença de bactérias do gênero *Macrocooccus* em alimentos é preocupante devido à possibilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos para bactérias com maior potencial patogênico e que são amplamente isoladas em alimentos, como os estafilococos. Como *Macrocooccus* e *Staphylococcus* podem compartilhar os mesmos hospedeiros, uma troca de elementos genéticos móveis entre espécies de ambos os gêneros é provável. Genes de resistência à meticilina identificados em estafilococos podem ser oriundos de macrococos através de mecanismos de transferência horizontal (BECKER *et al.*, 2018; MACFADYEN *et al.*, 2018).

3.3 GÊNERO *Kocuria*

Kocuria é um novo gênero derivado do gênero *Micrococcus*, tais bactérias foram descritas pela primeira vez em 1995 e nomeadas em homenagem a Miroslav Kocur, um dos primeiros microbiologistas a estudar cocos Gram-positivos. Hoje, o gênero abrange 26 espécies, sendo *Kocuria rosea*, *Kocuria varians* e *Kocuria kristinae* as mais estudadas. São cocos Gram-positivos, em sua maioria estritamente aeróbios, com exceção de *K. kristinae* que é facultativa, são catalase positivos e coagulase negativos, e não formam esporos (STACKEBRANDT *et al.*, 1995; JAY *et al.*, 2005; LPSN, 2022c).

Este gênero bacteriano é comumente encontrado em vários ambientes, como pele humana, cavidades orais, membranas mucosas e alimentos. Podem ser confundidos com *Staphylococcus* coagulase negativos pois, além de muitas vezes compartilharem os mesmos nichos, também podem crescer nos mesmos meios de cultura e apresentar colônias com características semelhantes. Sua identificação em alimentos tem aumentado devido à utilização de técnicas moleculares de identificação, e houve um aumento na incidência de diferentes tipos de infecções causadas por *Kocuria*, especialmente em pacientes imunodeprimidos e acometidos com doenças subjacentes graves (PURTY *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2021).

Algumas espécies de *Kocuria* vêm sendo usadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, como queijos, iogurte e outros derivados lácteos. As culturas “starters” são preparações contendo um grande número de microrganismos com o objetivo de se aproveitar os produtos derivados do metabolismo ou da atividade enzimática dessas culturas. Os microrganismos selecionados como culturas “starters” são isolados da microbiota nativa de produtos tradicionais, uma vez que estão bem adaptados às condições ambientais e do processamento dos alimentos, e são responsáveis por conferir características específicas de aparência, textura, aroma e sabor (DIEZ *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2021).

Um estudo demonstrou a possibilidade de se utilizar cepas de *Kocuria varians* juntamente com outros microrganismos, como cultura adicional. O objetivo foi reproduzir as características sensoriais do queijo tipo Tetilla (Galícia, Espanha), tradicionalmente feito com leite cru, em queijos elaborados com leite pasteurizado. Os pesquisadores concluíram que os queijos fabricados com as culturas adjuntas obtiveram pontuações altas para sabor e parâmetros sensoriais gerais, considerando os padrões do produto tradicional (CENTENO *et al.*, 2017).

A utilização de culturas iniciadoras em produtos fermentados também está associada a uma maior segurança do alimento. Permite que o período de fermentação seja menor, e o alimento tenha sabor, aroma e textura constantes, e pode ainda aumentar o prazo de validade dos produtos. Contudo, a maioria das culturas iniciadoras utilizadas são isoladas de produtos bem específicos e tradicionais, e/ou do ambiente de produção. Dessa forma, sua capacidade de inibir bactérias patogênicas

e deteriorantes deve ser previamente avaliada (CENTENO *et al.*, 2017; DIEZ *et al.*, 2021).

3.4 QUEIJOS ARTESANAIS

Os produtos artesanais do Estado de Minas Gerais possuem imenso valor cultural e econômico, dentre estes produtos estão os queijos artesanais. Por meio da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, o Estado de Minas Gerais considera o queijo Minas Artesanal como o queijo produzido conforme tradição histórica e cultural da região do Estado onde foi produzido, a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas. Podem ser utilizadas culturas lácticas naturais como pingo, soro fermentado ou soro-fermento, coalho e sal (MINAS GERAIS, 2002).

A partir de 2012 se tornou possível aos produtores de queijos não inseridos em regiões até então já identificadas e caracterizadas, como a Serra da Canastra e do Serro, solicitar ao Estado de Minas Gerais o reconhecimento de outros tipos de queijos artesanais oriundos de outras regiões. A Lei Estadual nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012, dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, e reconhece outros tipos de queijo, com base nos seus processos de produção. As variedades de queijos artesanais podem ser identificadas como derivadas das estabelecidas, e o processo de produção dos queijos artesanais devem ser documentados para fins de proteção do patrimônio histórico e cultural (MINAS GERAIS, 2012; PIRES *et al.*, 2019).

Recentemente a legislação que regulamenta o queijo artesanal em Minas Gerais foi atualizada. O Decreto Nº 48024 DE 19/08/2020 regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, e dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais no Estado. São as condições para a produção dos queijos artesanais: o leite deve ser proveniente de rebanho sadio, que não apresente sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses apresentem resultados negativos; o leite deve apresentar qualidade microbiológica e físico-química, conforme legislação vigente específica; o produtor de leite deve atender às boas práticas agropecuárias; a queijaria deve adotar as boas práticas de fabricação; o processamento pode ser orientado pela cultura regional, utilizar técnicas

tradicionais ou novas técnicas, desde que mantenham a aparência e o sabor específicos do tipo de queijo artesanal; técnicas e utensílios usados na produção devem ser predominantemente manuais, e não influenciar na qualidade do produto final (MINAS GERAIS, 2020).

O decreto também estabelece critérios a serem seguidos pelos produtores, desde a obtenção do leite até o final do processo de fabricação e venda. Para a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, o estabelecimento produtor deverá ser registrado no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) ou no Serviço de Inspeção Municipal (SIM) (MINAS GERAIS, 2020).

As regiões de produção dos queijos artesanais serão identificadas mediante estudo de caracterização do processo produtivo tradicional, considerando os aspectos socioculturais. Cada região produtora identificada será publicada em portarias específicas do IMA, mediante solicitação de organizações representativas dos produtores, junto à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Seapa). A Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater-MG) realizará estudos que comprovem a identidade, por meio da caracterização da região e seus processos produtivos tradicionais vinculados à atividade (MINAS GERAIS, 2020).

Duas novas regiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais foram caracterizadas pelo IMA. A portaria nº 2050, de 07 de abril de 2021 estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Artesanal de Alagoa, e a portaria IMA nº 2049, de 07 de abril de 2021 estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas.

O queijo Artesanal de Alagoa é caracterizado por um queijo elaborado a partir do leite cru, hígido, de produção própria, com utilização de soro fermento. O produto final deve apresentar consistência dura, textura tendendo a fechada, cor interna intermediária entre o branco a amarelada, sabor moderadamente salgado, suave a picante, e odor moderadamente pronunciado, conforme a tradição histórica e cultural do município de Alagoa, onde é produzido. A portaria nº 2050 estabelece todos os parâmetros e exigências para a fabricação do queijo, obtenção do leite, maturação,

armazenamento, condições de higiene, transporte e comercialização, bem como parâmetros microbiológicos (MINAS GERAIS, 2021b).

As características sensoriais e o processo de fabricação, maturação e comercialização do queijo Artesanal Mantiqueira de Minas é o mesmo do queijo Artesanal de Alagoa. Ele é classificado como um queijo de baixa umidade e gordo. As etapas de produção são: filtração, agitação, adição de fermento natural, adição de coalho, coagulação, corte da coalhada, aquecimento e mexedura da massa (45 °C a 51 °C), dessoragem, pré-prensagem e enformagem, prensagem e viragem, salga e maturação (mínimo 14 dias) (MINAS GERAIS, 2021a).

Visando atender à demanda oriunda de produtores de queijos de municípios inseridos no Corredor Ecológico da Mantiqueira, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Gado de Leite, em parceria com diferentes instituições do Estado de Minas Gerais, conduziu um projeto de caracterização do queijo artesanal produzido em dois desses municípios, Alagoa (queijo Artesanal de Alagoa) e Carvalhos (queijo Artesanal Mantiqueira de Minas) (PIRES *et al.*, 2019).

A partir das análises microbiológicas dos queijos analisados no projeto mencionado acima, foram isoladas estirpes inicialmente identificadas como *Staphylococcus* spp. a partir do leite cru, da salmoura, do soro-fermento e dos queijos em vários períodos de maturação. O presente trabalho teve como objetivo identificar estas estirpes em nível de espécie, bem como avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos destas estirpes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* e ESTOQUES DE TRABALHO

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo foram isoladas durante a realização de análises microbiológicas para um projeto de caracterização de queijos artesanais nos municípios de Alagoa e Carvalhos, no estado de Minas Gerais. As análises ocorreram entre os meses de maio a julho e outubro a dezembro de 2016, e março a abril de 2018. As estirpes foram isoladas a partir da pesquisa e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva do leite cru, soro-fermento e salmoura utilizados para a fabricação de queijos artesanais, bem como dos queijos em diferentes estágios de maturação, em dez propriedades produtoras de queijos artesanais dos municípios citados acima. A pesquisa e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada de acordo com as diretrizes da ISO 6888-1:1999.

As amostras foram isoladas em ágar Baird-Parker (Difco, Sparks, MD, EUA) e submetidas ao teste de coagulase em tubo para diferenciação entre SCP e SCN. O teste da coagulase foi feito com plasma de coelho desidratado (Coagu-Plasma, Laborclin, Pinhais, Paraná), conforme as instruções do fabricante. Estirpes coagulase positivas e negativas selecionadas do ágar Baird-Parker foram inoculadas em ágar BHI (ágar Infusão de Cérebro e Coração, Brain Heart Infusion Agar, Himedia, Mumbai, Índia). O crescimento bacteriano foi inicialmente analisado quanto à pureza e em seguida todo o crescimento da placa foi coletado com um suabe estéril e depositado em 1 ml de leite desnatado estéril (Skim Milk, Difco, Sparks, MD, EUA) com glicerol a 10% (Cromoline, Diadema, SP, Brasil), em microtubos, que foram acondicionados em freezer com temperatura de -20 °C para as análises posteriores.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES POR MALDI-TOF MS

A identificação das 109 estirpes estocadas para este estudo foi feita pela espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz/tempo de vôo (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS). Esta identificação foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde está instalado o espectrômetro de massas MALDI-TOF LT Microflex (Bruker Daltonics, MA, EUA). Os dados de massa espectral foram analisados com o *software* Flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics, MA, EUA), que faz a identificação do microrganismo de acordo com espectros contidos no banco de dados Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, MA, EUA).

4.2.1 Preparação das amostras bacterianas

As amostras foram preparadas de acordo com Oliveira *et al.* (2021). As bactérias foram inoculadas em ágar BHI e incubadas por 24 horas a 35 °C. Com auxílio de um palito de madeira, o material de uma ou mais colônias de cada amostra foi depositado na placa de aço inoxidável do equipamento, em duplicata.

Após a aplicação e secagem das amostras, foi adicionado 1 µl de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) sobre cada amostra, que ocasiona a lise das células bacterianas. Após a secagem, foi depositado sobre cada amostra 1 µl da matriz composta por uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em solução de acetonitrila a 50% (v/v) e ácido trifluoroacético a 2,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Estes solventes têm como finalidade penetrar na parede celular do microrganismo e extrair as proteínas intracelulares. Após mais uma etapa de secagem, a placa foi inserida no equipamento para a leitura das amostras.

A cepa *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como controle interno do equipamento. O equipamento faz a leitura em duplicata, então foram obtidas quatro identificações da mesma amostra. O maior escore concedido pelo programa, para cada amostra analisada, foi selecionado para a identificação da bactéria.

4.2.2 Obtenção dos dados espectrais e interpretação dos resultados

Os resultados são gerados através do programa computacional Flexcontrol 3.3 e os valores de escores podem variar de 0,0 a 3,0. Escores iguais ou maiores que 2,3 são considerados como identificação altamente provável para a espécie; entre 2,0 e 2,29 são considerados como identificação segura para gênero e provável para espécie; escores entre 1,7 e 1,9 são considerados como identificação provável apenas para gênero, enquanto que escores de identificação abaixo de 1,69 são considerados como identificação não confiável.

4.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar com discos de antibióticos, de acordo com documento do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013a), entidade internacional que preconiza como os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos devem ser realizados e interpretados. Foram testados antimicrobianos comumente utilizados na pecuária leiteira para controle de mastite bovina. Os antimicrobianos utilizados estão relacionados na Tabela 1, onde consta também a quantidade do antimicrobiano no disco (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e a classe à qual pertence.

Tabela 1 - Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar

Antimicrobiano	Classe a que pertence	Quantidade no disco
Penicilina G	Penicilinas	10 UI
Cefalotina	Cefalosporinas (1 ^a geração)	30 µg
Cefoxitina	Cefalosporinas (2 ^a geração)	30 µg
Ceftiofur	Cefalosporinas (3 ^a geração)	30 µg
Tetraciclina	Tetraciclinas	30 µg
Gentamicina	Aminoglicosídeos	10 µg
Enrofloxacina	Fluoroquinolonas	5 µg
Eritromicina	Macrolídeos	15 µg
Clindamicina	Lincosamidas	2 µg

Sulfonamidas	Sulfas	300 µg
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Trimetoprim/Sulfas	1,25/23,75 µg

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (MH), considerado pelo CLSI como o melhor para testes rotineiros de susceptibilidade, por serem reproduzidos de forma aceitável dentre os lotes nos testes de susceptibilidade, por conter baixos teores de inibidores a algumas classes de antimicrobianos, por permitir o crescimento de patógenos não fastidiosos, e pela existência de um grande número de informações a respeito da utilização deste meio em testes de susceptibilidade.

O ágar MH foi preparado a partir de uma base desidratada (Merck, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Após serem autoclavados, frascos contendo 600 ml do meio foram resfriados em banho-maria a 45 °C. O meio foi vertido dentro de uma capela de fluxo laminar, em placas de Petri descartáveis estéreis (150 x 15 mm), de 60 a 70 ml por placa. Após a solidificação, foi realizado o teste de esterilidade, com a incubação das placas a 30 °C por 24 horas.

Para o preparo dos inóculos, colônias previamente isoladas em ágar BHI foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de tubos tipo Vortex, para obter uma turbidez semelhante ao do tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland.

A suspensão bacteriana foi inoculada no ágar MH com o auxílio de um suabe estéril. O suabe foi mergulhado na suspensão bacteriana e o excesso da suspensão foi eliminado, pressionando-se o suabe nas paredes internas do frasco. Em seguida, o suabe foi estriado em toda superfície do ágar, e esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, girando a placa num ângulo aproximado de 60° a cada vez.

Para aplicação dos discos na placa foi utilizado um dispensador de discos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). Após aplicação dos discos, cada um foi pressionado no ágar com auxílio de uma pinça flambada, para garantir o total contato do disco com o meio. Em seguida as placas foram submetidas à incubação a 35 °C, por 24 horas.

O controle de qualidade dos testes foi feito utilizando-se a cepa *S. aureus* ATCC 25923, que foi submetida semanalmente ao teste de disco-difusão, juntamente com as demais amostras.

Após o período de incubação de 24 horas a 35 °C foi feita a leitura das placas. Após este período, o meio inoculado deve apresentar um crescimento confluyente. O diâmetro dos halos foi medido em milímetros, com uma régua, incluído o diâmetro dos discos. O resultado das medições foi comparado com parâmetros estabelecidos em documento do CLSI (CLSI, 2013b) para bactérias de origem animal.

Algumas estirpes apresentaram pouco ou nenhum crescimento em ágar MH. Estas foram testadas novamente em ágar MH adicionado de sangue de carneiro, que é o meio de cultivo utilizado nos testes de susceptibilidade de bactérias fastidiosas (CLSI, 2013a).

4.4 PESQUISA DO GENE *mecA*

4.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) bacteriano foi feita conforme descrito por Hesselbarth e Schwarz, 1995. As amostras foram isoladas em placas de ágar BHI e incubadas por 24 horas a 35 °C. Uma colônia de cada estirpe foi transferida para tubos contendo 3 ml de caldo BHI, que foram incubados a 35° C por 24 horas.

Foram transferidas alíquotas de 2 ml da cultura em caldo BHI para tubos tipo Eppendorf, que foram centrifugados a 12.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi dispensado, e foi adicionado 1 ml de TES (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0,1 mM EDTA). As amostras foram agitadas em Vortex e centrifugadas a 12.000 rpm por cinco minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 500 µl de TES. As amostras foram agitadas em Vortex e adicionou-se 8 µl de lisostafina (1mg/ml). As amostras foram novamente agitadas em Vortex e incubadas a 37 °C por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 20 µl de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10% e os tubos foram agitados lentamente até o conteúdo ficar gelatinoso, e permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Então foram adicionados 500 µl de Fenol e Clorofórmio/Isoamil (1:1) e os tubos foram agitados vigorosamente, e em seguida centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com auxílio de ponteiras cortadas na ponta, para facilitar a aspiração do conteúdo gelatinoso. Esta última etapa foi repetida mais uma vez. Por fim adicionou-se 500 µl de Clorofórmio/Isoamil (24:1), os tubos foram agitados cuidadosamente e centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos, e o sobrenadante transferido para outro microtubo.

Então foi adicionado 500 µl de isopropanol e os tubos foram girados várias vezes, até a formação de um precipitado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e os tubos permaneceram abertos dentro da capela de exaustão para secagem dos péletes (DNA). Após a secagem, adicionou-se 40 µl de água ultrapura (mili-Q), e os tubos foram armazenados na geladeira até o dia seguinte. Após este período foram armazenados em freezer a -20 °C.

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria de absorvância de ultravioleta (UV) (Nano Drop, ND-1000). A quantidade de radiação UV absorvida por uma solução de DNA é diretamente proporcional à quantidade de DNA na amostra. A absorvância foi medida a 260 nm, e nesse comprimento de onda uma absorvância de 1 corresponde a 50 µg de DNA dupla fita por ml. As concentrações para realização das reações de PCR foram ajustadas para 100 ng/ml.

4.4.2 Amplificação do gene *mecA*

A pesquisa do gene *mecA* foi realizada por reação em cadeia da polimerase, conforme descrito por Santos et al. (2016). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami *et al.* (1991). Uma estirpe de *S. epidermidis mecA*-positiva foi utilizada como controle positivo do teste e *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle negativo. O volume final da reação de PCR foi de 25 µl, contendo 16,5 µl de água mili-Q, 5 µl de PCR MasterMix (Ludwig Biotecnologia), 1 µl de cada iniciador (10 pmol / µl Synbio Technologies), 0,5 µl da enzima Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia) e 2 µl de DNA (100 ng). O programa de PCR teve início com uma etapa de 5 min de desnaturação, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 74 °C por 2 min, com uma extensão final de 74 °C por 5 minutos.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado a 0,8% com tampão TBE 1x (0,09 M Tris, 0,09 M ácido bórico, 0,002 M EDTA). Em cada poço do gel foi adicionado 10 µl de cada

produto de amplificação e 4 µl de corante (Promega). A eletroforese em gel foi realizada em cuba horizontal com tampão TBE 1 x a 40 V durante 5 minutos, e a 100 V por 60 minutos. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg / ml), e fotografado sob luz UV.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES

Cento e nove estirpes isoladas de queijos, leite, soro-fermento e salmoura foram identificadas nos seguintes gêneros: *Staphylococcus* (n=75), *Enterococcus* (18), *Klebsiella* (6), *Enterobacter* (1), *Corynebacterium* (2), *Kocuria* (3) e *Macrococcus* (4). Para a continuação deste trabalho, ou seja, para a caracterização do fenótipo de resistência e pesquisa do gene *mecA* foram considerados somente os cocos Gram-positivos catalase positivos (n=82) pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Kocuria* e *Macrococcus* (Tabela 2).

Tabela 2- Espécies de cocos Gram-positivos catalase positivos isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e queijos artesanais

Identificação	Nº de estirpes
<i>Staphylococcus aureus</i>	52
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	14
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Staphylococcus succinus</i>	2
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1

<i>Kocuria salsicia</i>	2
<i>Kocuria kristinae</i>	1
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	4
TOTAL:	82

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Dentre as 75 amostras identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, 28 (37,3%) foram identificadas com escore igual ou superior a 2,3, que significa uma identificação altamente provável para espécie; 38 estirpes (50,7%) foram identificadas com escore entre 2,0 e 2,29, identificação provável para espécie; e nove estirpes (12%) foram identificadas com escore entre 1,7 e 1,9, provável para gênero (Apêndice A).

Das 52 estirpes de *S. aureus* isoladas, 33 estirpes foram isoladas de queijos, onze de leite cru, sete de salmoura e uma estirpe foi isolada do soro-fermento (Apêndice A). Todas as estirpes foram identificadas por MALDI-TOF MS com escore superior a 2,0.

As estirpes de *S. saprophyticus* foram isoladas de queijos (n=10), de leite cru (n=1) e de salmoura (n=3). Sete delas foram identificadas com escores acima de 2,0, enquanto que as outras sete foram identificadas com escores entre 1,8 e 1,9. As estirpes de *S. epidermidis* foram isoladas de salmoura (n=2) e de leite (n=1). Todas apresentaram escores de identificação acima de 2,0.

As estirpes de *S. succinus* foram isoladas de leite cru (n=1) e de soro-fermento (n=1) e apresentaram escores de identificação de 1,7 e 1,8. As estirpes de *S. chromogenes* e *S. haemolyticus* foram isoladas de leite cru, *S. warneri* de salmoura e *S. xylosum* de queijo. Essas quatro últimas estirpes foram identificadas com escores acima de 2,0.

As quatro estirpes de *Macrococcus* identificadas pertencem à espécie *M. caseolyticus*. Três foram identificadas com escore provável para espécie (2,0 a 2,2), e uma foi identificada com escore 1,9, provável para gênero. As estirpes identificadas como *Macrococcus caseolyticus* foram isoladas de leite cru (n=1) e de queijos (n=3).

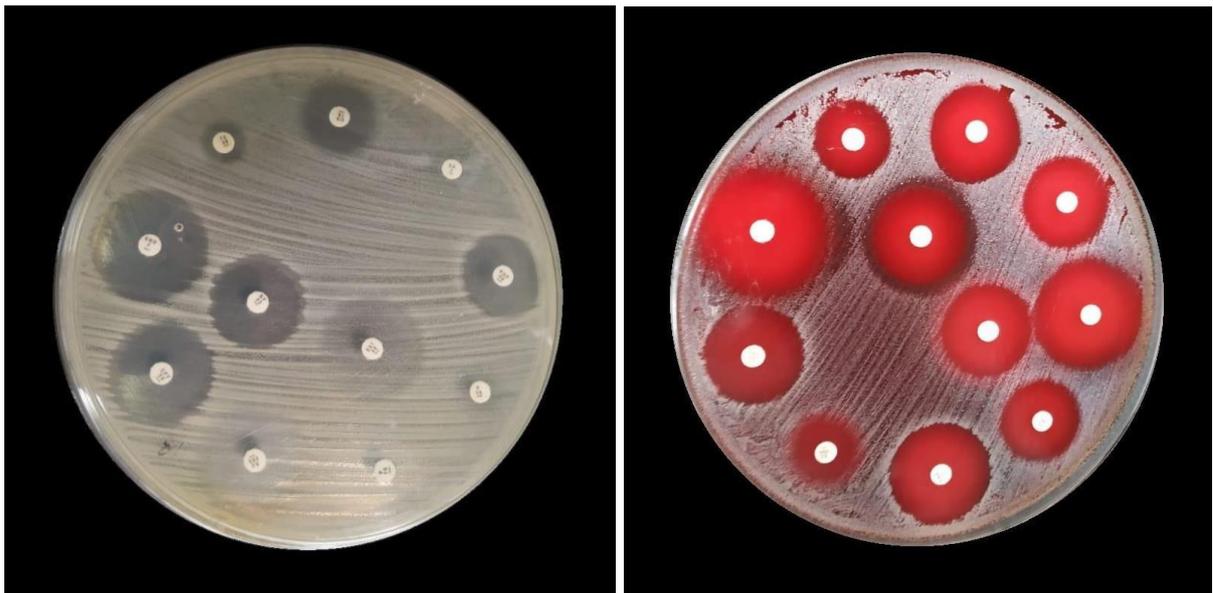
Das três estirpes de *Kocuria* identificadas, duas pertencem à espécie *K. salsicia*, sendo que uma foi identificada com escore provável para espécie (2,2), e uma

foi identificada com escore provável para gênero (1,8), e uma estirpe foi identificada como *K. kristinae* com escore de 2,2. As estirpes identificadas como *K. salsicia* foram isoladas de leite cru (n=1) e de queijo (n=1) e a estirpe identificada como *K. kristinae* foi isolada de soro-fermento.

5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os resultados do teste de disco-difusão em ágar e a classificação das amostras como sensíveis ou resistentes se encontram no Apêndice A.

Figura 3 - Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar



(1) Ágar Mueller-Hinton

(2) Ágar Mueller-Hinton com sangue

Fonte: Autora (2022).

De 82 amostras isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e queijos artesanais, 65 (79,3%) apresentaram resistência a algum antimicrobiano, e 14 (17,1%) apresentaram multirresistência (resistência a três ou mais antimicrobianos). Das 75 estirpes de *Staphylococcus* testadas, somente 13 foram susceptíveis a todos os antimicrobianos, quatro *S. aureus* e nove *S. saprophyticus*. O perfil de resistência das estirpes é apresentado na Tabela 3.

A espécie *S. aureus* apresentou nove diferentes perfis de resistência e dez estirpes apresentaram o mesmo perfil de multirresistência (resistência à penicilina, tetraciclina e sulfonamidas). Somente quatro das 52 estirpes (7,7%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Uma estirpe de *S. aureus* foi positiva para o gene *mecA* na reação de PCR, embora não tenha apresentado resistência fenotípica a outros β -lactâmicos além de penicilina.

Tabela 3 - Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em estirpes de *Staphylococcus*, *Kocuria* e *Micrococcus* isoladas de leite cru, soro-fermento, salmoura e de queijos artesanais

Identificação	Perfil de resistência	Nº estirpes	Gene <i>mecA</i>
<i>S. aureus</i>	Susceptível*	4	-
	Pen	13	-
	Pen, Tet	10	-
	Pen,Tet,Sul**	10	-
	Pen,Sul	6	-
	Tet,Sul	3	-
	Tet	3	-
	Pen,Gen	1	Presente
	Pen,Gen	1	-
	Tet,Eri	1	-
<i>S. saprophyticus</i>	Susceptível	9	-
	Tet	2	-
	Pen	1	-
	Pen,Tet	1	-
	Pen,Eri,Sxt**	1	-
<i>S. epidermidis</i>	Pen,Gen	1	-
	Pen, Cefoxi, Ceftio, Tet, Gen, Eri, Enro, Sul**	1	Presente
	Pen,Tet	1	-

<i>S. succinus</i>	Pen	2	-
<i>S. chromogenes</i>	Pen	1	-
<i>S. haemolyticus</i>	Pen, Cefalo, Cefoxi, Ceftio, Tet, Gen, Eri, Enro, Sul, Sxt**	1	Presente
<i>S. warneri</i>	Pen,Eri,Clinda**	1	-
<i>S. xylosus</i>	Pen,Tet	1	-
<i>K. salsicia</i>	Susceptível	1	-
	Pen	1	-
<i>K. kristinae</i>	Susceptível	1	-
<i>M. caseolyticus</i>	Susceptível	2	-
	Pen,Sul	1	-
	Tet	1	-
TOTAL:		82	

*susceptível a todos os antimicrobianos testados; **estirpes multirresistentes; - ausência. Cefalo: cefalotina; Cefoxi: cefoxitina; Ceftio: ceftiofur; Clinda: clindamicina; Enro: enrofloxacina; Eri: eritromicina; Gen: gentamicina; Pen: penicilina; Sul: sulfonamidas; Tet: tetraciclina; Sxt: sulfametoxazol com trimetoprim;

Fonte: elaborado pela autora (2022).

S. saprophyticus apresentou quatro diferentes perfis de resistência e nove estirpes (64,3%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. *S. epidermidis* apresentou três diferentes perfis de resistência, sendo que uma estirpe apresentou multirresistência a seis diferentes classes de antimicrobianos e presença do gene *mecA*.

As duas estirpes de *S. succinus* e a estirpe de *S. chromogenes* apresentaram resistência à penicilina. A única espécie de *S. haemolyticus* apresentou multirresistência a sete diferentes classes de antimicrobianos e presença do gene

mecA. *S. warneri* apresentou resistência à penicilina, eritromicina e clindamicina e *S. xylosus* resistência à penicilina e tetraciclina.

Duas estirpes de *Kocuria* (*K. kristinae* e *K. salsicia*) e uma estirpe de *Macrocooccus caseolyticus* foram susceptíveis a todos os antimicrobianos; uma estirpe de *K. salsicia* apresentou resistência à penicilina, uma estirpe de *M. caseolyticus* apresentou resistência à penicilina e sulfametoxazol e outra estirpe de *M. caseolyticus* apresentou resistência à tetraciclina.

Informações sobre o número e a percentagem de estirpes de *Staphylococcus* resistentes aos diferentes antimicrobianos testados estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1- Número e percentagem de estirpes do gênero *Staphylococcus* isoladas de queijos artesanais, leite cru, soro-fermento e salmoura, resistentes a diferentes antimicrobianos

Antimicrobiano	Total (n=75)		<i>S. aureus</i> (n=52)		SCN (n=23)	
	n	%	n	%	n	%
Penicilina	53	70,7	41	78,8	12	52,2
Cefalotina	1	1,3	0	0	1	4,3
Ceftiofur	2	2,7	0	0	2	8,7
Cefoxitina	2	2,7	0	0	2	8,7
Tetraciclina	34	45,3	27	51,9	7	30,4
Gentamicina	5	6,7	2	3,8	3	13,0
Eritromicina	5	6,7	1	1,9	4	17,4
Clindamicina	1	1,3	0	0	1	4,3
Enrofloxacina	2	2,7	0	0	2	8,7
Sulfa	21	28	19	36,5	2	8,7
Sulfametoxazol + Trimetoprim	2	2,7	0	0	2	8,7

Fonte: elaborado pela autora (2022).

No total, 70,7% das estirpes de *Staphylococcus* foram resistentes à penicilina, 45,3% foram resistentes à tetraciclina e 28% resistentes às sulfonamidas. Comparando as estirpes de *S. aureus* com as do grupo de SCN, 78,8% foram resistentes à penicilina, 51,9% foram resistentes à tetraciclina e 36,5 % resistentes às sulfonamidas, em contraste com 52,2% de resistência à penicilina, 30,4% de resistência à tetraciclina e 8,7% de resistência às sulfonamidas no grupo de SCN. Estirpes do grupo de SCN, entretanto, apresentaram resistência às cefalosporinas,

clindamicina, enrofloxacina e sulfametoxazol com trimetoprim, que não foram observadas em *S. aureus*.

No Quadro 2 podem ser observados os fenótipos de resistência apresentados pelas diferentes espécies de *Staphylococcus*, em relação à resistência a um ou mais antimicrobianos.

Quadro 2 - Fenótipo de resistência apresentado por espécies de *Staphylococcus* isoladas de queijos artesanais, leite cru, soro-fermento e salmoura

Espécie	N° estirpes	Estirpes susceptíveis		Resistência a 1 antimicrobiano		Resistência a 2 antimicrobianos		Resistência a 3 ou mais antimicrobianos	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S. aureus</i>	52	4	7,7	16	30,8	22	42,3	10	19,2
<i>S. saprophyticus</i>	14	9	64,3	3	21,5	1	7,1	1	7,1
<i>S. epidermidis</i>	3	0	0	0	0	2	66,7	1	33,3
<i>S. succinus</i>	2	0	0	2	100	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	1	0	0	1	100	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	100
<i>S. warneri</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	100
<i>S. xylosus</i>	1	0	0	0	0	2	100	0	0
TOTAL	75	13	15,8	22	26,8	27	32,9	14	17,1

Fonte: elaborado pela autora (2022).

As três espécies isoladas com maior frequência neste estudo diferiram em relação à distribuição da resistência. A maioria das estirpes de *S. aureus* apresentou resistência concomitante a dois antimicrobianos (42,3%), seguida pela resistência a um antimicrobiano (30,8%) e a três ou mais antimicrobianos (19,2%). Já 64,3% das estirpes de *S. saprophyticus* foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, 21,5% foi resistente a um único antimicrobiano, uma estirpe foi resistente a dois antimicrobianos e uma estirpe foi resistente a três antimicrobianos. E das três estirpes

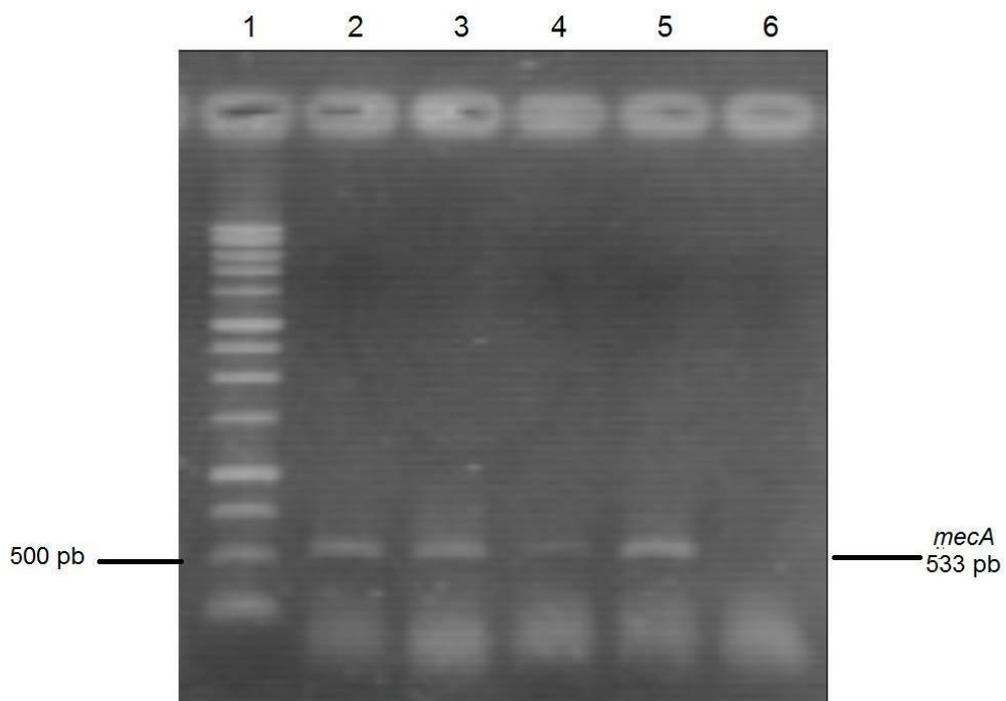
de *S. epidermidis*, duas foram resistentes a dois antimicrobianos e uma a mais de três antimicrobianos.

O antimicrobiano com maior percentual de resistência foi a penicilina, 67,1%, seguido de tetraciclina, que apresentou um percentual de resistência de 42,7%, e sulfonamidas, com 26,8% de resistência.

5.3 PRESENÇA DO GENE *mecA*

O gene *mecA* foi encontrado em três das estirpes analisadas (Figura 4). Todas pertenciam ao gênero *Staphylococcus* e foram identificadas como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. As estirpes de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, incluindo resistência fenotípica à cefoxitina, comum em *Staphylococcus* resistentes à meticilina. Entretanto, a estirpe de *S. aureus* positiva para o gene *mecA* não apresentou multirresistência, nem resistência à cefoxitina, sendo resistente apenas à penicilina e gentamicina.

Figura 4 - Fotografia da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 533 pb do gene *mecA* detectados em *Staphylococcus* spp. Isolados de leite cru e salmoura



Canaleta 1: marcador de peso molecular; canaleta 2: *S. aureus* 53; canaleta 3: *S. epidermidis* 65; canaleta 4: *S. haemolyticus* 86; canaleta 5: controle positivo; canaleta 6: controle negativo (branco).

Fonte: Autora (2022).

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência de espécies de *Staphylococcus* isoladas de leite cru, salmoura, soro-fermento e queijos produzidos artesanalmente em dois municípios do Estado de Minas Gerais. Colônias típicas e atípicas foram selecionadas a partir do ágar Baird-Parker utilizado para a enumeração de estafilococos coagulase positivos destes produtos.

A identificação por MALDI-TOF MS revelou a presença de *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus*, além de bactérias pertencentes a outros gêneros, como *Micrococcus*, *Kocuria*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* e bactérias Gram-negativas. O ágar Baird-Parker é um meio seletivo e diferencial para *S. aureus*, possui em sua composição telurito de potássio, cloreto de lítio e glicina. *S. aureus* reduz anaeróbia e aerobicamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras. A suplementação do meio com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica de *S. aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação esbranquiçada ao redor da colônia (BAIRD-PARKER, 1962).

O fabricante do ágar Baird-Parker utilizado (Difco & BBL, 2009) indica o meio para isolamento seletivo e enumeração de SCP de alimentos, pele, solo, ar e outros materiais. Colônias típicas de *S. aureus* são pretas, brilhantes, convexas e cercadas por halos claros (reação gema de ovo) de aproximadamente 2-5 mm. SCN geralmente não crescem bem, e quando crescem apresentam colônias negras e os halos claros típicos estão ausentes. A maioria dos outros microrganismos também não cresce bem

neste meio, mas alguns podem se desenvolver ocasionalmente produzindo colônias brancas a marrons, sem halos claros.

Viçosa *et al.* (2010) avaliaram o ágar Baird-Parker em relação à enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase e termonuclease positivos, concluindo que 59% das colônias típicas testadas não apresentaram resultado positivo para coagulase e 54% não apresentaram atividade de termonuclease, indicando que não existe uma boa relação entre colônias típicas e a presença de SCP. Por este motivo, na enumeração de SCP são testadas colônias típicas e atípicas que crescem neste meio de cultura. Sendo assim, o ágar Baird-Parker não é inibitório para outros microrganismos, apenas seletivo para SCP. Portanto, outros microrganismos podem crescer neste meio, sendo necessária a confirmação dos microrganismos isolados por meio da microscopia ou teste da coagulase e teste da catalase.

Dentre as espécies de *Staphylococcus* identificadas neste estudo, 69,3% eram *S. aureus*. Resultado similar (60% de *S. aureus*) foi reportado por Kümmel *et al.* (2016), ao pesquisar a presença de *S. aureus* em leite de quartos mamários, de leite de tanque a granel, de queijos duros elaborados com leite cru em diferentes fases de maturação e durante as etapas de produção em um laticínio na Suíça. Liu *et al.* (2017), entretanto, reportaram uma prevalência de 27,7% de *S. aureus* isolados de leite cru no norte da China.

André *et al.* (2008) realizaram um estudo em um laticínio em Goiás e encontraram *S. aureus* em 70,8% das amostras de queijo Minas frescal, em 66,7% das amostras de leite cru, em 32,6% das amostras de fossas nasais e em 30,4% das mãos de manipuladores de alimentos. Portanto, portadores assintomáticos de *S. aureus* desempenham papel importante na manutenção da disseminação desses microrganismos na cadeia de produção de leite e derivados.

Costanzo *et al.* (2020) avaliaram 245 amostras de queijo de leite cru de vacas e ovelhas recolhidos em mercados locais na Itália. SCP foram isolados em todas as amostras analisadas. Tais dados ressaltam a importância da vigilância sobre a ocorrência de *Staphylococcus* em leite e queijos.

Apesar de não ser associado frequentemente a amostras de alimentos, *S. saprophyticus* foi a segunda espécie mais identificada neste estudo. Esta espécie coagulase negativa é comumente relacionada a infecções urinárias comunitárias,

podendo estar associada à contaminação proveniente de manipuladores (BECKER *et al.*, 2014).

Coton *et al.* (2010), em um estudo realizado na França, identificou 17 diferentes espécies de SCN a partir do leite cru, de queijos e do ambiente. As espécies encontradas com maior frequência foram *S. equorum* (23,3%), *S. xylosus* (20,3%), *S. succinus* (10,6%) e *S. saprophyticus* (10,1%).

Neste estudo, além de espécies de *Staphylococcus*, espécies de outros dois gêneros de cocos Gram-positivos catalase positivos também foram identificadas, espécies dos gêneros *Kocuria* e *Macrococcus*. A diferenciação destes gêneros de estirpes de SCN se tornou mais frequente com a utilização da técnica de MALDI-TOF MS.

Macrococcus spp. também foi identificado em um estudo sobre a diversidade microbiana durante a fermentação do leite para fabricação do queijo artesanal tipo Kazak, na China. Segundo Zheng *et al.* (2021), sua presença foi observada principalmente nos estágios iniciais da fermentação, com redução nos estágios finais, e juntamente com outros microrganismos contribuiu para a formação de aminoácidos livres, além de participar na degradação de carboidratos associados a sabor do queijo e a valores nutricionais.

Milani *et al.* (2019) analisaram amostras de queijarias especializadas na fabricação de queijo parmesão, na Itália. Foi feita avaliação microbiológica de amostras de fezes, da cama, de leite de vacas de diferentes criações e de queijos parmesão frescos. *K. kristinae* foi identificada em amostras de fezes, leite e queijos. Foi observado que bactérias da microbiota intestinal bovina e da cama modulam a microbiota do leite e, conseqüentemente, do queijo.

S. aureus é um dos principais causadores de mastite bovina, e a resistência aos antimicrobianos vem sendo identificada com frequência em isolados de rebanhos leiteiros. Silva *et al.* (2014a) analisaram a prevalência e as características moleculares de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolados de leite de vacas com mastite em uma fazenda do Estado de São Paulo. Isolados de MRSA foram recuperados de 11% das vacas com mastite. Todos os isolados MRSA apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados, incluindo penicilina, oxacilina e cefoxitina.

Com o objetivo estimar a prevalência de *S. aureus* em leite cru obtido de vacas com mastite clínica, Wang *et al.* (2018) analisaram 195 amostras individuais de leite de vacas de fazendas leiteiras em Pequim, China. Dentre as amostras, 46,2% foram confirmadas como *S. aureus*, e uma estirpe era portadora do gene *mecA*. MRSA também foi identificado por Taban *et al.* (2021) em amostras de leite cru e queijo em conserva, na Turquia. Ambos os isolados continham o gene *mecA*.

Neste estudo 78,8% das estirpes de *S. aureus* foram resistentes à penicilina, seguido por resistência à tetraciclina (51,9%) e às sulfonamidas (36,5 %). Liu *et al.* (2017) avaliaram isolados de *S. aureus* obtidos de leite cru quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos. A resistência mais observada em seu estudo também foi à penicilina (85,2%), seguida de ampicilina (79,6%) e eritromicina (46,3%). Apesar das amostras apresentarem resistência à oxacilina (29,6%) e à cefoxitina (42,6%), o gene *mecA* não foi detectado.

Ferreira *et al.* (2016) também encontraram elevada resistência à penicilina (44,8%) ao determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de queijos Minas frescal artesanais e industrializados em Goiás. Contudo, nenhuma das estirpes foi resistente à cefoxitina. Outros mecanismos estão envolvidos na resistência aos β -lactâmicos além da síntese de PBP2A pelo gene *mecA*, como produção de penicilinases, codificada pelo gene *blaZ*, que inativa o anel β -lactâmico presente nos fármacos dessa classe.

Lemma *et al.* (2021) investigaram a ocorrência de *S. aureus* e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de leite e outros produtos lácteos na Etiópia. Nos isolados de *S. aureus* testados, a maior taxa de resistência foi observada para ampicilina (94,2%), seguida de amoxicilina-ácido clavulânico (80,8%) e tetraciclina (46,2%). A resistência à cefoxitina foi observada em 38,5% dos isolados, no entanto, apenas 5% desses continham o gene *mecA*.

Neste estudo, 7,7% das estirpes de *S. aureus* foram susceptíveis a todos os antibióticos testados. Resultado diferente foi reportado por Riva *et al.* (2015), que avaliaram a presença de *S. aureus* em leite cru e caracterizaram a susceptibilidade antimicrobiana destes isolados obtidos de rebanhos leiteiros do norte da Itália. Mais da metade dos isolados (62,8%) foi suscetível a todos os antibacterianos testados.

A estirpe de *S. aureus* positiva para o gene *mecA* identificada neste estudo não apresentou resistência à cefoxitina. A utilização da cefoxitina no teste de disco-difusão em ágar para detecção de resistência à meticilina vem sendo recomendada pelo CLSI desde 2004. A recomendação é baseada em relatos acerca do uso de cefoxitina e de sua ação indutora do sistema regulatório do gene *mecA* (SWENSON *et al.*, 2007).

Isolados que têm o gene *mecA*, mas são susceptíveis à cefoxitina podem ser denominados como pré-MRSA. Tal ocorrência é explicada pela regulação do gene *mecA*. Esses isolados carregam os elementos repressores e indutores que regulam o gene *mecA* (*mecI* e *mecR1*). A repressão codificada pelo gene *mecI* da transcrição do gene *mecA* é responsável pelo fenótipo de suscetibilidade aparente à meticilina de pré-MRSA (KUWAHARA-ARA *et al.* 1996; PETINAKI *et al.*, 2001). Sendo assim, os métodos fenotípicos para detecção de resistência à meticilina podem ser de difícil interpretação e a detecção por PCR do gene *mecA* nem sempre está associada ao fenótipo de resistência.

S. aureus é a espécie de *Staphylococcus* mais relacionada a patologias, tanto em humanos, como em animais. Contudo, a importância dos SCN está aumentando devido à maior detecção destes microrganismos como agentes causadores de infecções e ocorrência de resistência a antimicrobianos. Neste estudo foram identificadas 23 estirpes de SCN.

S. saprophyticus apresentou pouca resistência aos antimicrobianos. Das 14 estirpes analisadas, 64,3% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos e apenas uma apresentou multirresistência. Nunes *et al.* (2016), por outro lado, identificaram multirresistência em diversas estirpes de *S. saprophyticus* isoladas de queijos Minas frescal de diferentes marcas comercializadas em um município do Estado do Rio de Janeiro, incluindo resistência aos β -lactâmicos.

A resistência à cefoxitina e a presença do gene *mecA* foi observada em duas estirpes de SCN identificadas como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* neste estudo. Estas duas estirpes apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, a oito e a dez dos antimicrobianos testados, respectivamente. *S. epidermidis mecA* positivo foi isolado de salmoura, enquanto que *S. haemolyticus mecA* positivo foi isolado de leite cru.

Aragão *et al.* (2021) também identificaram *S. epidermidis* positivo para o gene *mecA*. A estirpe foi isolada da cavidade nasal de um manipulador que trabalhava na fabricação de queijo coalho de ovelha elaborado com leite cru, em Pernambuco. Na Polônia, Chajęcka-Wierzchowska *et al.* (2019) isolaram estirpes de *S. epidermidis* a partir de queijos artesanais, 26% delas eram resistentes à meticilina e continham o gene *mecA*.

Kurekci (2016) também encontrou o gene *mecA* em duas estirpes de *S. epidermidis* e em uma estirpe de *S. haemolyticus* isoladas de queijos artesanais de leite de cabra e ovelha, na Turquia. Na Índia, Mahato *et al.* (2017) identificaram uma estirpe de *S. epidermidis* isolada de leite de vaca com mastite clínica susceptível à oxacilina e *mecA* positiva. Osman *et al.* (2016) encontraram duas estirpes de *S. epidermidis mecA* positivas resistentes à penicilina e sensíveis à oxacilina isoladas de leite de vacas, no Egito.

Em São Paulo, Ribeiro *et al.* (2020) identificaram o gene *mecA* e resistência à oxacilina e penicilina em estirpes de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* isoladas das mãos de manipuladores e de queijos artesanais.

Padrões de suscetibilidade antimicrobiana e ocorrência do gene *mecA* também foram avaliados em SCN isolados de queijo Minas frescal em Juiz de Fora por Fontes *et al.* (2013). Altas porcentagens de resistência antimicrobiana foram observadas para penicilina (78,5%), eritromicina (67,8%) e gentamicina (47,2%) e 80,6% dos isolados foram classificados como multirresistentes. Esses autores relataram também 76,2% de resistência à oxacilina e 81,5% de SCN portadores do gene *mecA*.

Klibi *et al.* (2018) pesquisou a incidência de resistência a antimicrobianos de diferentes espécies de SCN isoladas de vacas com mastite clínica na Tunísia. Vinte dos 68 isolados de SCN (29,41%) apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina e 14 deles carregavam o gene *mecA*. Os isolados restantes foram negativos para os genes *mecA* e *mecC*, porém todos eram resistentes à cefoxitina. Silva *et al.* (2014b) avaliaram o perfil e resistência aos antimicrobianos de SCN isolados de leite de vacas com mastite no Brasil. A resistência à cefoxitina e oxacilina, bem como presença do gene *mecA* foi observada em 20% dos isolados. As espécies isoladas foram: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. hyicus* e *S. simulans*.

Neste estudo nenhuma das estirpes de *Kocuria* e *Micrococcus* apresentaram multirresistência aos antimicrobianos ou resistência à cefoxitina, nem o gene *mecA*. Oliveira *et al.* (2022), por outro lado, identificaram *K. marina* e *M. caseolyticus* multirresistentes e resistentes à cefoxitina, isolados do leite de vacas com mastite subclínica pela técnica de MALDI-TOF MS, na região Nordeste do País. O isolado de *K. marina* foi resistente à cefoxitina, gentamicina e tetraciclina, e a estirpe de *M. caseolyticus* apresentou resistência à ampicilina, cefoxitina, eritromicina, oxacilina e penicilina.

M. caseolyticus foi o segundo coco Gram-positivo mais detectado (18,3% dos isolados) por Resende *et al.* (2018) em amostras de queijo Minas frescal comercializados em mercados de Juiz de Fora. O gene *mecA* foi identificado em 36,8% dos isolados de *M. caseolyticus*.

7 CONCLUSÃO

A ocorrência de estirpes de *Staphylococcus* multirresistentes aos antimicrobianos, isoladas a partir de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua fabricação, e a presença do gene *mecA* em três dessas estirpes, incluindo um *S. aureus*, ressaltam a importância da vigilância sobre a qualidade microbiológica do leite cru e dos queijos artesanais produzidos em Minas Gerais. Tais achados preocupam dada a possibilidade de disseminação de resistência antimicrobiana para a microbiota de produtores e consumidores.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.
- AL-ASHMAWY, M. A.; SALLAM, K. I.; ABD-ELGHANY, S. M.; ELHADIDY, M.; TAMURA, T. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 3, p. 156-162, 2016.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *Sma*I digestion. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 200-207, 2008.
- ARAGÃO, B. B.; TRAJANO, S. C.; MELO, R. P. B.; PAJEÚ, B.; MOTA, R. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in handler of cheese made with goat's milk in Brazil. **Ciência Rural**, v. 51, n. 8, p. 1-4, 2021.
- BASTOS, M. C. F. Resistência Bacteriana a Drogas. *In*: VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. (Eds.). **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 541-561
- BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 25, n. 1, p. 12–19, 1962.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle**

de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Situação Epidemiológica dos surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA).** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view> . Acesso em: 24. jun. 2022

CASTRO, R. D.; PEDROSO, H. S. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, G. O.; LUIZ, K. C. M.; DIAS, R. S.; FILHO, R. A. T.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SANTOS, S. G.; NUNES, A. C.; SOUZA, M. R. 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**, v. 103, n. 3, 2020.

CENTENO, J. A.; GARABAL, J. I.; DOCAMPO F.; LORENZO, J. M.; CARBALLO, J. Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavour and sensory attributes by using *Kocuria varians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 33-40, 2017.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-Resistant Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 2, p. 173-186, 1988.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; GAJEWSKA, J. S. *epidermidis* strains from artisanal cheese made from unpasteurized milk in Poland - Genetic characterization of antimicrobial resistance and virulence determinants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 294, p. 55-59, 2019.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Approved Standard, 4th ed. CLSI document VET01–A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Second Informational Supplement. CLSI document VET01–S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013b.

COTON, E; DESMONTS, M; LEROY, S; COTON, M; JAMET, E; CHRISTIEANS, G; DONNIO, P; LEBERT, I; TALON, R. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 221–229, 2010.

COSTANZO, N.; CENITI, C.; SANTORO, A.; CLAUSI, M. T.; CASALINUOVO, F. Foodborne Pathogen Assessment in Raw Milk Cheeses. **International Journal of Food Science**, v. 2020 |Article ID 3616713, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2020/3616713/> Acesso em 08/07/2022.

DORNELES, E. M. S.; FONSECA, M. D. A. M.; ABREU, J. A. P.; LAGE, A. P.; BRITO, M. A. V. P.; PEREIRA, C. R.; BRANDÃO, H. M.; GUIMARÃES, A. S.; HEINEMANN, M. B. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. 1-7, 2019.

Difco™ & BBL™ Manual. **Manual of Microbiological Culture Media**. 2. ed. Sparks, Maryland, 2009. 700 p. Disponível em: https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf. Acesso em 07/06/2022.

Ferreira, M.A.; Bernardo, L. G.; Neves, L. S.; Campos, M. R. H.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRÉ, M. C. P. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8589-8597, 2016.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

FONTES, C. O.; SILVA, V. L.; 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. M594-M599, 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 602 p.

GILL, A. A. S.; SINGH, S.; THAPLIYAL, N.; KARPOORMATH, R. Nanomaterial-based optical and electrochemical techniques for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 2, p. [19], 2019.

GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; V.; RICHINI-PEREIRA, B.; LANGONI, H. *Short communication*: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 726-730, 2017.

GUVEN, K.; MUTLU, M. B.; GULBANDILAR, A.; ÇAKIR, P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 1, p. 196–212, 2010.

HESELBARTH, J; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 11-17, 1995.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Nova York: Springer, 2005. 790 p.

KASA, G.; TEGEGNE, B.; TADESSE, B. Isolation and identification of major pathogenic bacteria from clinical mastitic cows in Asella Town, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. 6656755-6656755, 2020.

KHAN, C. M. (Ed). **Manual Merck de Veterinária**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2013. 3472 p. *E-book*

KLIBI, A.; MAAROUFI, A.; TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 6, p. 930-935, 2018.

KLOOS, W. E.; BALLARD, D. N.; GEORGE, C. G.; WEBSTER, J. A.; HUBNER, R. J.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; FIEDLER, F.; SCHUBERT, K. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* sp. nov., *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 859-877, 1998.

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

KUCHENBECKER, B. S.; RIBEIRO, A. R.; CARDOSO, M. Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2009.

KÜMMEL, J; STESSL, B; GONANO, M; WALCHER, G; BEREUTER, O; FRICKER, M; GRUNERT, T; WAGNER, M; EHLING-SCHULZ, M. *Staphylococcus aureus* Entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from Dairy Cow to Cheese. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1603-1603, 2016.

KUREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2675-2679, 2016.

KUWAHARA-ARAI, K.; KONDO, N.; HORI, S.; TATEDA-SUZUKI, E.; HIRAMATSU, K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecl*-mediated repression of PBP 2' production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2680-2685, 1996.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; REIS, D. R. L.; MACHADO, M. A.; GUIMARAES, A. S.; AZEVEDO, A. L. S.; SALLES, E. B.; ALVIM, M. C. T.; SILVA, R. F.; MEURER, I. R. Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 4, p. 382-388, 2015.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; COSTA, E. O.; JOAQUIM, S. F.; MENOZZI, B. D. Celularidade do leite e Unidades Formadoras de Colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 518-524. 2015

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance – the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 1057-1098, 2013.

LIU, H.; LI, S.; MENG, L.; DONG, L.; ZHAO, S.; LAN, X.; WANG, J.; ZHENG, N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8796-8803, 2017.

LEMMA, F.; ALEMAYEHU, H.; STRINGER, A.; EGUALE, T. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus aureus* in Milk and Traditionally Processed Dairy Products in Addis Ababa, Ethiopia. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1-7, 2021.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LPSN. List of Procariotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>. Acesso em 11 jul. 2022a.

LPSN. List of Procariotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Macrococcus*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/macrococcus>. Acesso em 15 jun. 2022b.

LPSN. List of Procariotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Kocuria*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/kocuria>. Acesso em 11 jul. 2022c.

MACFADYEN, A. C.; FISHER, E. A.; COSTA, B.; CULLEN, C.; PATERSON, G. K. Genome analysis of methicillin resistance in *Macrococcus caseolyticus* from dairy cattle in England and Wales. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 8: e000191, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159548/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BUCKLEY, D. H.; STHAL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960 p.

MAHATO, S.; MISTRY, H. U.; CHAKRABORTY, S.; SHARMA, P.; SARAVANAN, R.; BHANDARI, V. Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative staphylococci in milk samples from mastitic cows in Índia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1446-1446, 2017.

MARANAN, M. C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 813-849, 1997.

MILANI, C.; DURANTI, S.; NAPOLI, S.; ALESSANDRI, G.; MANCABELLI, L.; ANZALONE, R.; LONGHI, G.; VIAPPIANI, A.; MANGIFESTA, M.; LUGLI, G. A.; BERNASCONI, S.; OSSIPRANDI, M. C.; SINDEREN, D.; VENTURA, M.; TURRONI, F. Colonization of the human gut by bovine bacteria present in Parmesan cheese. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1286-1286, 2019.

MINAS GERAIS. Decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. **Minas Gerais Diário do Executivo**, 6 jun. 2002. p. 18. Disponível em: <http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf> Acesso em: 10 fev. 2020.

MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Minas Gerais Diário do Executivo**, 19 dez. 2012. p. 1, col. 2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=20549&comp=&ano=2012>>. Acesso em; 10 fev. 2020.

MINAS GERAIS. Decreto 48024, de 19 de agosto de 2020. Regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Minas Gerais Diário do Executivo**, 20 agos. 2020 Pág. 1 Col. 1. Disponível em: <<http://jornal.iof.mg.gov.br/xmlui/handle/123456789/237554>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

MINAS GERAIS. Portaria nº 2049, de 07 de abril de 2021. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas. **Minas Gerais IMA**, 7 abril 2021^a. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/1819-portarias/1966-portarias-ano-2021>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

MINAS GERAIS. Portaria nº 2050, de 07 de abril de 2021. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Artesanal de Alagoa. **Minas Gerais IMA**, 7 abril 2021^b. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/1819-portarias/1966-portarias-ano-2021>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, A. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.

MURPHY, J. T.; WALSH, R. Modelling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach. *In*: DUBITZKY, D.; SOUTHGATE, J.; HENDRIK, F. **Understanding the Dynamics of Biological Systems: Lessons Learned from Integrative Systems Biology**. Nova York: Springer, 2011. p.131-154.

NUNES, R. S. S.; CAMILLA, P.S.; PEREIRA, K. S.; DEL AGUILA, E. M.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v.99, n. 4, p. 2641-2653, 2016.

OLIVEIRA, R. P.; ARAGÃO, B. B.; MELO, R. P. B.; SILVA, D. M.S.; CARVALHO, R. G.; JULIANO, M. P.; FARIAS, M. P. O.; LIRA, N. S. C.; MOTA, R. A. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and

genotypic profile of antimicrobial resistance. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 85, p. 101802-101802, 2022.

OLIVEIRA, T. C. A.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; VICENTINI, N. M.; LANGE, C. C. Identification of bovine mastitis pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry in Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 88, p. 302-306, 2021.

OSMAN, K. M.; KHALED A. A. R.; MARIE, H. S.H.; ARAFA, A. Coagulase-negative staphylococci collected from bovine milk: species and antimicrobial gene diversity. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 1, p. 89-99, 2016.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278–282, 2009.

PETINAKI, E.; ARVANITI, A.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 297–304, 2001.

PICOLI, T.; ZANI, J. L.; BANDEIRA, F. S.; ROLL, V. F. V.; RIBEIRO, M. E. R.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; LIMA, M.; MEIRELES, M. C. A.; FISCHER, G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microrganismos em leite cru. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2471-2480, 2014.

PIRES, M. F. A.; LANGE, C. C.; BORGES, C. A. V.; DINIZ, F. H.; SEABRA, J. C. S.; MARTINS, C. E.; MAGALHÃES, F. A. R.; LEMOS, A. M.; MAGALHÃES JÚNIOR, W. C. P.; VICENTINI, N. M. **Caracterização do Queijo Artesanal de Alagoa-MG: parâmetros físicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019.

PURTY, S.; SARANATHAN, R.; PRASHANTH, K.; NARAYANAN, K.; ASIR, J.; DEVI, S. C.; AMARNATH, S. K. The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, n. 10, p.e71-8, 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S. **Microbiologia Veterinária Essencial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. 208 p. *E-book*.

RESENDE, J. A.; FONTES, C. O.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; NASCIMENTO, T. C.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Antimicrobial-Resistance Genetic Markers in Potentially Pathogenic Gram Positive Cocci Isolated from Brazilian Soft Cheese. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 2, p. 377-385, 2018.

RIBEIRO, L. F.; RAFAEL, A. S.; ANDRESSA, S. P.; ROSSI, G. A. M.; AMARAL, L. A. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. on Brazilian Dairy Farms that Produce Unpasteurized Cheese. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 779, 2020.

RIVA, A.; BORGHI, E.; CIRASOLA, D.; COLMEGNA, S.; BORGIO, F.; AMATO, E.; PONTELLO, M. M.; MORACE, G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in

- Raw Milk: Prevalence, SCCmec Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 6, p. 1142-1146, 2015.
- SANTOS, F. F.; MENDONÇA, L. C.; REIS, D. R. L.; GUIMARÃES, A. S.; LANGE, C. C.; RIBEIRO, J. B.; MACHADO, M. A.; BRITO, M. A. V. P. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1–9, 2016.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.
- SANTOS, R.; GONZÁLEZ-REVELLO, A.; MAJUL, L.; UMPIÉRREZ, A.; ALDROVANDI, A.; GIL, A.; HIRIGOYEN, D.; ZUNINO, P. Subclinical bovine mastitis associated with *Staphylococcus* spp. in eleven Uruguayan dairy farms. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n. 4, p. 630-637, 2022.
- SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R.; FISCHER, U.; FALLER, A.; ENDL, J. Identification of *Micrococcus candidus* ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of *Micrococcus caseolyticus* ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as Members of a New Species, *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 15 -20, 1998.
- SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; FERNANDES-JÚNIOR, A.; GOMEZ-SANZ, E.; GOMEZ, P.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 227-233, 2014a.
- SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 227–233, 2014b.
- SILVEIRA FILHO, V. M.; LUZ, I. S.; CAMPOS, A. P. F.; SILVA, W. M.; BARROS, M. P. S.; MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; LEAL-BALBINO, T. C. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in Northeast Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 583-591, 2014.
- SOARES, B. S.; MELO, D. A.; MOTTA, C. C.; MARQUES, V. F.; BARRETO, N. B.; COELHO, S. M. O.; COELHO, I. S.; SOUZA, M. M. S. Characterization of virulence and antibiotic profile and *agr* typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 843-850, 2017.
- SONG, X.; HUANG, X.; XU, H.; ZHANG, C.; CHEN, S.; LIU, F.; GUAN, S.; ZHANG, S.; ZHU, K.; WU, C. The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. **Veterinary Microbiology**, v. 247, p. 108757, 2020.
- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

SPANU, V.; SCARANO, C.; COSSU, F.; PALA, C.; SPANU, C.; DE SANTIS, E. P. L. Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. M2066-M2071, 2014.

STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIAK, O.; SCHUMANN, P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 682-92, 1995.

SWENSON, J. M.; LONSWAY, D.; McALLISTER, S.; THOMPSON, A.; JEVITT, L.; ZHU, W.; PATEL, J. B. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 33-39, 2007.

TABAN, B. M.; HASSANKHANI, A.; AYTAC, S. A. Investigation of *mecA*- and *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* from raw milk and traditional artisanal dairy foods. **International Journal of Food Properties**, v. 24, n. 1, p. 954-964, 2021.

TEGEGNE, H. A.; FLORIANOVÁ, M.; GELBÌCOVA, T.; KARPSIKOVA, R.; KOLACKOVA, I. Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk of cows, sheep, and goats. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 1, p. 68-73, 2019.

VIÇOSA, G. B.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm® Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 447-452, 2010.

WANG, W.; LIN, X.; JIANG, T.; PENG, Z.; XU, J.; YI, L.; I, F.; FANNING, S.; BALOCH, Z. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1123-1123, 2018.

YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 427-431, 2011.

ZHENG, X.; XU, X.; MA, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; DENG, L.; SHI, X.; WANG, B. Diversity and potential function of bacterial communities during milk fermentation of Kazak artisanal cheese. **Process Biochemistry (1991)**, v. 111, p. 191-200, 2021.

APÊNDICE A. Resultados da identificação bacteriana por MALDI-TOF MS e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. (Continua)

Nº	Identificação MALDI-TOF MS	Escore	Substrato	Origem	Cefalo	Cefoxi	Ceftio	Clinda	Enro	Eri	Gen	Pen	Sul	Tet	SXT
1	<i>S. aureus</i>	2,0	Queijo	Produtor 1	36	31	32	30	34	32	20	19R	R	10R	29
2	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 1	37	31	31	30	30	30	20	21R	R	10R	30
3	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 1	34	30	30	32	32	30	20	18R	R	10R	29
4	<i>Kocuria salsicia</i>	1,8	Queijo	Produtor 1	33	27	26	24	30	28	22	23R	22	28	24
5	<i>S. aureus</i>	2,3	Leite	Produtor 1	46	26	26	26	30	25	21	44	22	23	30
6	<i>S. aureus</i>	2,2	Leite	Produtor 1	46	27	25	30	30	29	22	48	22	25	30
7	<i>S. aureus</i>	2,4	Leite	Produtor 1	34	30	30	28	32	29	19	20R	R	9R	28
8	<i>Kocuria salsicia</i>	2,1	Leite	Produtor 1	44	40	50	38	26	50	32	50	40	38	36
10	<i>S. saprophyticus</i>	2,0	Salmoura	Produtor 1	34	27	28	34	30	31	28	30	26	30	35
11	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 2	38	31	32	28	34	30	20	20R	15I	11R	28
12	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 2	30	30	28	28	29	29	20	17R	21	23	29
13	<i>S. aureus</i>	2,1	Leite	Produtor 2	30	28	29	28	30	26	18	17R	17	25	29
14	<i>S. aureus</i>	2,1	Salmoura	Produtor 2	38	28	30	30	34	32	24	30	24	28	32
15	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 3	44	31	30	27	33	30	19	28R	R	27	29
16	<i>M. caseolyticus</i>	2,0	Queijo	Produtor 3	32	34	32	28	29	30	25	22R	16R	24	24
17	<i>S. aureus</i>	2,2	Leite	Produtor 3	44	33	31	28	33	32	23	31	R	12R	29
19	<i>S. saprophyticus</i>	1,9	Queijo	Produtor 1	34	28	25	37	31	34	29	36	23	30	32
20	<i>S. saprophyticus</i>	1,8	Queijo	Produtor 2	40	32	32	38	31	32	31	34	26	30	34
21	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 2	33	27	28	27	29	28	20	16R	26	23	29
22	<i>S. saprophyticus</i>	1,8	Queijo	Produtor 3	35	26	25	34	27	33	26	27R	20	28	33
23	<i>S. saprophyticus</i>	2,2	Queijo	Produtor 3	39	26	27	37	34	35	32	36	27	16R	36
24	<i>S. xylosus</i>	2,0	Queijo	Produtor 1	34	29	28	29	28	28	25	26R	22	9R	29
25	<i>S. saprophyticus</i>	2,0	Queijo	Produtor 2	38	32	33	38	32	32	29	33	28	30	36
26	<i>S. saprophyticus</i>	2,0	Queijo	Produtor 3	36	27	29	33	29	31	27	32	20	09R	32
27	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	35	29	29	26	32	28	19	19R	17	25	25
28	<i>Kocuria kristinae</i>	2,2	Soro-fermento	Produtor 4	36	36	36	26	26	40	27	44	26	36	22
29	<i>S. aureus</i>	2,2	Salmoura	Produtor 4	30	29	27	27	27	28	20	16R	20	9R	27
38	<i>S. saprophyticus</i>	1,9	Queijo	Produtor 2	40	37	39	37	34	35	34	32	30	35	35

APÊNDICE A - Resultados da identificação bacteriana por MALDI-TOF MS e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. (Continua)

N°	Identificação MALDI-TOF MS	Escore	Substrato	Origem	Cefalo	Cefoxi	Ceftio	Clinda	Enro	Eri	Gen	Pen	Sul	Tet	SXT
39	<i>S. saprophyticus</i>	1,8	Queijo	Produtor 3	36	25	26	34	30	34	29	29	22	30	34
40	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 4	37	29	28	28	32	29	20	20R	17	25	29
41	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	32	30	30	25	29	29	25	17R	20	11R	29
42	<i>M. caseolyticus</i>	2,2	Queijo	Produtor 5	50	38	44	22	40	34	30	50	22	32	29
43	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 5	36	31	30	29	29	30	19	18R	R	25	28
44	<i>S. chromogenes</i>	2,2	Leite	Produtor 5	50	40	40	38	40	40	33	20R	22	34	34
45	<i>S. warneri</i>	2,0	Salmoura	Produtor 5	38	33	32	R	32	R	25	22R	24	27	34
46	<i>S. aureus</i>	2,3	Salmoura	Produtor 5	36	30	31	30	31	30	19	19R	R	26	29
47	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	34	28	29	27	29	28	20	17R	17	10R	30
48	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 4	33	33	29	28	29	28	24	17R	22	11R	29
49	<i>M. caseolyticus</i>	2,2	Queijo	Produtor 5	50	40	44	26	34	30	32	50	17	30	26
50	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 5	36	31	29	30	30	30	20	19R	R	26	29
51	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 6	31	28	28	27	29	26	20	17R	23	23	29
52	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 6	32	29	30	28	30	28	8R	20R	25	22	29
53	<i>S. aureus</i>	2,3	Leite	Produtor 6	31	29	29	27	29	28	8R	17R	24	23	29
54	<i>S. epidermidis</i>	2,0	Leite	Produtor 6	34	28	22	32	36	32	9R	18R	30	29	24
55	<i>S. succinus</i>	1,8	Soro-fermento	Produtor 6	36	26	28	29	30	28	26	26R	20	26	29
56	<i>S. saprophyticus</i>	1,8	Salmoura	Produtor 6	34	27	26	34	32	34	32	29	27	29	34
63	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 1	30	28	24	26	26	26	23	15R	20	24	27
64	<i>S. aureus</i>	2,2	Leite	Produtor 1	26	29	27	24	26	28	19	17R	17	24	26
65	<i>S. epidermidis</i>	2,0	Salmoura	Produtor 1	26	14R	19I	34	19I	R	R	12R	R	R	29
66	<i>S. aureus</i>	2,2	Salmoura	Produtor 1	32	28	30	26	30	28	23	17R	16I	10R	25
67	<i>S. succinus</i>	1,7	Queijo	Produtor 1	36	29	27	28	28	30	30	27R	26	28	29
68	<i>S. saprophyticus</i>	1,9	Queijo	Produtor 1	40	29	26	32	26	30	30	27R	28	R	32
69	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 2	31	27	24	26	30	28	22	16R	19	9R	27
71	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 3	40	28	30	26	28	30	22	25R	12R	10R	23
73	<i>S. saprophyticus</i>	2,0	Leite	Produtor 2	32	28	26	30	29	R	30	17R	30	29	R
75	<i>S. aureus</i>	2,2	Leite	Produtor 3	35	29	30	27	28	27	20	19R	15I	9R	29

APÊNDICE A - Resultados da identificação bacteriana por MALDI-TOF MS e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. (Conclusão)

Nº	Identificação MALDI-TOF MS	Escore	Substrato	Origem	Cefalo	Cefoxi	Ceftio	Clinda	Enro	Eri	Gen	Pen	Sul	Tet	SXT
78	<i>S. aureus</i>	2,2	Salmoura	Produtor 2	38	27	31	30	35	29	22	27R	28	27	31
82	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	40	36	30	27	29	25	18	21R	18	9R	28
83	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	44	32	34	34	31	33	25	26R	R	30	30
85	<i>S. aureus</i>	2,2	Salmoura	Produtor 4	31	28	30	25	29	27	20	15R	20	25	27
86	<i>S. haemolyticus</i>	2,1	Leite	Produtor 5	R	R	R	30	17l	R	9R	R	R	R	R
87	<i>S. aureus</i>	2,3	Leite	Produtor 5	30	26	32	28	27	26	22	15R	21	24	27
88	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 5	31	28	30	25	28	27	25	25R	21	10R	28
90	<i>S. saprophyticus</i>	2,1	Salmoura	Produtor 5	46	34	35	40	32	34	32	33	30	30	34
91	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 6	32	31	28	31	32	29	21	18R	24	25	29
92	<i>S. aureus</i>	2,3	Leite	Produtor 6	26	30	25	26	28	26	22	14R	18	26	26
93	<i>S. epidermidis</i>	2,0	Salmoura	Produtor 6	40	40	42	30	36	28	28	25R	22	15R	32
94	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 5	34	30	27	30	31	30	24	20R	24	10R	30
101	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 1	31	35	29	26	30	28	24	19R	24	R	29
102	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 1	32	29	29	30	31	28	24	19R	25	R	30
103	<i>S. saprophyticus</i>	2,0	Queijo	Produtor 2	44	38	35	40	32	34	38	34	26	34	36
106	<i>S. aureus</i>	2,2	Salmoura	Produtor 4	40	28	34	31	34	31	22	43	16R	15R	30
109	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 3	36	33	37	32	33	30	24	19R	11R	9R	26
110	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	40	26	33	28	32	29	20	40	19	16R	28
111	<i>S. aureus</i>	2,2	Leite	Produtor 4	38	33	38	37	35	32	25	22R	16R	10R	27
112	<i>M. caseolyticus</i>	1,9	Leite	Produtor 4	40	30	32	26	30	31	29	39	28	R	27
114	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	44	30	32	31	34	32	25	42	20	14R	18
118	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 1	38	34	32	32	31	35	27	44	25	30	30
119	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 1	37	34	37	32	34	34	24	20R	R	30	24
123	<i>S. aureus</i>	2,2	Queijo	Produtor 4	42	31	27	29	32	31	27	40	20	R	26
126	<i>S. aureus</i>	2,3	Queijo	Produtor 4	40	26	30	28	44	18l	24	44	20	16l	24
127	<i>S. aureus</i>	2,3	Soro-fermento	Produtor 4	40	28	28	30	32	30	25	42	16l	16l	25

Escore: de identificação por MALDI-TOF MS; Cefalo: cefalotina; Cefoxi: cefoxitina; Ceftio: ceftiofur; Clinda: clindamicina; Enro: enrofloxacina; Eri: eritromicina; Gen: gentamicina; Pen: penicilina; Sul: sulfonamidas; Tet: tetraciclina; SXT: sulfametoxazol com trimetoprim; R: resistente; l: intermediário. Os números nas colunas dos antimicrobianos se referem ao diâmetro do halo de inibição, em centímetros.