

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS**

Ana Caroline Lopes de Paula Macedo

**Microbiota do queijo Minas Frescal: diversidade bacteriana e resistência aos
antimicrobianos**

Juiz de Fora

2023

Ana Caroline Lopes de Paula Macedo

Microbiota do queijo Minas Frescal: diversidade bacteriana e resistência aos antimicrobianos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Imunologia & Doenças Infectoparasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Coorientador: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva

Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros

Juiz de Fora

2023

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

Macedo, Ana Caroline Lopes de Paula.

Microbiota do queijo Minas Frescal: diversidade bacteriana e resistência aos antimicrobianos / Ana Caroline Lopes de Paula Macedo. -- 2023.

106 p. : il.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Vânia Lúcia da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Queijo Minas Frescal. 2. Microbiota. 3. Resistência aos antimicrobianos. 4. Sequenciamento de alto rendimento. 5. Integron.
I. Diniz, Cláudio Galuppo , orient. II. da Silva, Vânia Lúcia, coorient.
III. Título.

Ana Caroline Lopes de Paula Macedo

**MICROBIOTA DO QUEIJO MINAS FRESCAL: DIVERSIDADE BACTERIANA E RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutora em
Ciências Biológicas.

Área de
concentração: Imunologia
& Doenças
Infectoparasitárias.

Aprovada em 22 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Vânia Lucia da Silva - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Julliane Dutra Medeiros - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Cláudia Oliveira Fontes

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Yasmin Neves Vieira Sabino

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Felipe Alves de Almeida

Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Juiz de Fora, 01/12/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Alves de Almeida, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 16:58, 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 **Yasmin Neves Vieira Sabino, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 16:58, 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 **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 22/12/2023, às 16:58, 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 **Julliane Dutra Medeiros, Professor(a)**, em 22/12/2023, às 16:59, 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 **Claudia Oliveira Fontes, Professor(a)**, em 22/12/2023, às 17:01, 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 **Vania Lucia da Silva, Professor(a)**, em 22/12/2023, às 17:18, 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 **Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Usuário Externo**, em 18/01/2024, às 20:42, 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-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1604356** e o código CRC **8447AE3B**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua infinita graça e amor. Minha verdadeira fonte de força e paz durante essa caminhada. Tudo é dEle, por Ele e para Ele!

Ao Rafael, meu esposo e meu maior incentivador, dedico esse trabalho. Você foi meu grande porto seguro nos dias mais difíceis. Obrigada por sempre me fazer lembrar o quanto sou especial e capaz. Estar ao seu lado torna a vida mais leve.

À minha querida filha Maria Eduarda, que chegou no meio dessa caminhada, por me ensinar uma linda e intensa forma de amor, que antes não conhecia. Você é herança do Senhor na minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Vânia minha eterna gratidão por tudo que sempre fizeram por mim. Obrigada pelas orações e por torcerem pela minha felicidade e sucesso. Eu amo muito vocês!

À minha sogra e sogro, Lúcia e Janir, por todo apoio e ajuda durante essa trajetória. Vocês foram essenciais para que essa conquista fosse possível.

Ao meu orientador e coorientadora, Cláudio e Vânia, por todos os conhecimentos compartilhados, pela orientação e compreensão durante esses anos, mesmo com os contratempos que tive durante a trajetória do doutorado.

À minha coorientadora Julliane, agradeço por cada ensinamento e contribuição para o trabalho, cada palavra de incentivo, pela paciência e por todos os bons momentos que vivemos juntas. Você é uma grande inspiração para mim.

A todos os companheiros de laboratório, em especial a Michele, pelo convívio e compartilhamentos de experiências durante esses anos.

Aos alunos de iniciação científica que direta ou indiretamente ajudaram na execução desse trabalho.

Aos amigos que me acompanharam durante essa trajetória e torceram por mim.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem se desanime,
pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar”

Josué 1:9

RESUMO

A microbiota dos queijos é bastante diversificada e sua caracterização pode fornecer informações relevantes sobre qualidade microbiológica e questões sanitárias. Investigações sobre o papel dos queijos como reservatório de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem suscitado preocupações, à medida que o fenômeno da resistência ganha visibilidade na abordagem de Saúde Única. Considerando a relevância econômica e cultural do Queijo Minas Frescal (QMF), o objetivo deste estudo foi elucidar a identidade de populações bacterianas dominantes em sua microbiota através do sequenciamento de alto rendimento, e investigar o envolvimento do QMF na ecologia da resistência aos antimicrobianos. Para o sequenciamento da microbiota, o fluxo de trabalho consistiu no processamento das amostras, extração de DNA, preparação da biblioteca de *amplicon* 16S rRNA, sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq e análise de dados utilizando ferramentas de bioinformática. Além disso, os padrões de suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos foram avaliados para bastonetes Gram-negativos isolados de amostras de QMF em Ágar MacConkey. A extração de DNA e pesquisa de integron de classe 1 por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para os isolados que apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos testados. Três bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGNNF) foram selecionados para o sequenciamento completo do genoma, baseando-se na relevância do fenótipo de resistência apresentado e na presença de integrons de classe 1. Primeiramente, através do sequenciamento da microbiota do QMF, observou-se que os queijos foram agrupados em marcas, exibindo perfis bacterianos únicos que variaram em diversidade e abundância de táxons. O filo Proteobacteria foi dominante em todas as amostras, correspondendo a uma média de 88,7% de todas as sequências. Grupos de bactérias associados a baixa qualidade sanitária como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Vibrio* foram frequentes na maioria das marcas. A microbiota central comum (*core*) compartilhado por 100% das amostras apresentou predominância de enterobactérias. Um total de 217 bastonetes Gram negativos foram recuperados por cultura seletiva das amostras de QMF. O perfil de susceptibilidade dos isolados recuperados demonstrou que, entre as enterobactérias, 37% foram resistentes à ampicilina, 10% a cefoxitina e 16% a amoxicilina. Entre os BGNNF, 76% foram resistentes a ampicilina, 71% ao sulfazotrim e 6% a ceftazidima. O gene para integron de classe 1 foi detectado em três isolados BGNNF resistentes a ampicilina e sulfazotrim, dos quais dois pertenciam a mesma linhagem. Os isolados selecionados para o sequenciamento completo de genoma foram identificados como *Acinetobacter ursingii*, *Pseudomonas juntendi* e *Pseudomonas* spp. Análises preliminares dos genomas revelaram a presença de genes associados a expressão de bombas de efluxo e resistência aos aminoglicosídeos. Em geral, os dados relatados apontam para uma preocupação quanto à ocorrência de patógenos oportunistas em QMF, os quais podem atuar como hospedeiros de genes de resistência aos antimicrobianos, configurando um risco adicional para os consumidores.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal; Microbiota; Sequenciamento de alto rendimento; Resistência; Antimicrobiano; Integron.

ABSTRACT

The cheese microbiota is highly diverse, and its characterization may provide knowledge about microbiological quality and sanitary safety issues. Of special interest concerns are rising on the role of cheeses as reservoir of bacteria resistant to antimicrobial drugs as the resistance phenomena gain visibility in the One Health approach. Considering economic and cultural relevance of Minas Frescal Cheese (MFC), the aim of this study was to elucidate the identity of dominant bacterial populations in its microbiota through high-throughput sequencing, and to investigate the involvement of MFC in the ecology of antimicrobial drug-resistance. For microbiota sequencing, the workflow consisted of sample processing, DNA extraction, 16S rRNA amplicon library preparation, sequencing on the Illumina MiSeq platform and bioinformatics data analysis. In a second moment, antimicrobial susceptibility patterns were evaluated for Gram-negative rods isolated in QMF samples on MacConkey Agar. DNA extraction and class 1 integron screening using the polymerase chain reaction (PCR) technique were performed for isolates that showed resistance to any of the antimicrobials tested. Three non-fermenting Gram negative (NFGN) rods were selected, based on the relevance of their resistance phenotype and presence of class1 integrons, for whole genome sequencing. In high-throughput sequencing analysis, it was observed that cheeses were brand-clustered, exhibiting unique bacterial profiles which varied in diversity and abundance of taxa. Proteobacteria dominated in all samples, corresponding to a mean of 88.7% from all sequences. Bacteria groups associated with low sanitary quality such as, as *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Vibrio* were highly frequent in most of brands. The core microbiome shared by 100% of the samples showed predominance of enterobacteria. The susceptibility profile of the recovered isolates demonstrated that, among enterobacteria, 37% were resistant to ampicillin, 10% to cefoxitin and 16% to amoxicillin. Among NFGN rods, 76% were resistant to ampicillin, 71% to sulfazotrim and 6% to ceftazidime. The class 1 integron gene was detected in three NFGN rods resistant to ampicillin and sulfazotrim, of which two belonged to the same strain. The isolates selected for whole genome sequencing were identified as *Acinetobacter ursingii*, *Pseudomonas juntendi* and *Pseudomonas* ssp. Preliminary analyzes indicated the presence of genes associated to efflux pumps and resistance to aminoglycosides in the genomes. In general, these data highlight to a concern regarding the occurrence of opportunistic pathogens in QMF, which can act as hosts for antimicrobial resistance genes, posing an additional risk for consumers.

Key Words: Minas Frescal Cheese; High throughput sequencing; Microbiota; Resistance; Antimicrobial; Integron.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais antimicrobianos.....	24
Tabela 2. Números de leitura obtidos do sequenciamento, número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), estimadores de riqueza e índices de diversidade das marcas, normalizados para 15.000 leituras.....	53
Tabela 3. Caracterização e quantidade dos morfotipos obtidos em Ágar MacConkey.....	59
Tabela 4. Identificação presuntiva dos bastonetes Gram negativos isolados de Queijo Minas Frescal (QMF).....	60
Tabela 5. Distribuição dos fenótipos de resistência aos antimicrobianos selecionados para o estudo.....	63
Tabela 6. Métricas da qualidade de montagem dos genomas dos isolados de queijos Minas Frescal (QMF).....	64
Tabela 7. Identificação das amostras Q2 e Q3 pelo parâmetro de identidade média de nucleotídeo (ANI).....	65
Tabela 8. Características genômicas obtidas pela anotação automática através do PATRIC.....	66
Tabela 9. Genes de resistência encontrados nos genomas dos isolados de queijos Minas Frescal (QMF) por meio do software ABRicate.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal.....	19
Figura 2. Estrutura do integron. A plataforma básica do integron consiste em: <i>intl</i> , um gene para a integrase; <i>Pc</i> , um promotor constitutivo; <i>attI</i> , um sítio de recombinação; e cassetes gênicos, inseridos sequencialmente através da recombinação entre o sítio <i>attI</i> e os locais de recombinação associados aos cassetes (<i>attC</i>).....	35
Figura 3. Visão geral das diferentes abordagens de sequenciamento aplicáveis à microbiologia de alimentos.....	39
Figura 4. Delineamento experimental.....	42
Figura 5. Subcultivo dos isolados em Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) e experimentos posteriores.....	47
Figura 6. Curvas de rarefação de diferentes marcas de Queijo Minas Frescal (QMF). A rarefação foi estimada usando o software QIIME com base no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observado (normalizado para 15.000) de cada marca.....	53
Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras de queijo Minas Frescal (QMF), geradas com matriz de distância ponderada Unifrac. As cores referem-se à marca A (vermelho), marca B (azul escuro), marca C (laranja), marca D (verde), marca E (roxo), marca F (amarelo), marca G (azul claro).....	54
Figura 8. Abundâncias relativas de bactérias no (a) nível de filos (b) e nível de gêneros. Os resultados são mostrados como uma média de leituras geradas a partir de amostras individuais de queijo de cada marca. Apenas filos e gêneros com abundância relativa maior ou igual a 1% ($\geq 1\%$) foram incluídos. Todas as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com menor abundância foram agrupadas como “outras”.....	56
Figura 9. Microbiota core. (a) Box plots exibindo a mediana, mínimo, máximo, primeiro e terceiro quartis do número de leituras atribuídas às 20 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) mais abundantes da microbiota central comum detectada em todas as amostras de queijo. (b) Abundâncias relativas das famílias correspondentes às 20 OTUs mais abundantes do microbioma central comum. As cores referem-se a representantes da família Enterobacteriaceae (laranja), família Pseudomonadaceae (azul), família Enterococaceae (verde) e família Moraxellaceae (cinza).....	57
Figura 10: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas.....	62
Figura 11. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) isolados.....	62
Figura 12. Qualidade da sequência por base da amostra Q1 após a trimagem.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANI *Average Nucleotide Identity*

AMC Amoxicilina/Ácido Clavulânico

AMI Amicacina

AMP Ampicilina

ANOVA Análise da variância

ATM Aztreonam

APS Ampicilina/Sulbactam

BAL Bactérias láticas

BGNF Bastonetes Gram-negativos não fermentadores

BHI “Brain Heart Infusion” Infusão Cérebro Coração

CAZ Ceftazidima

CEMIC Centro de Estudos em Microbiologia

CFO Cefoxitina

CFZ Cefazolina

CIM Concentração Inibitória Mínima

CIP Ciprofloxacino

CLO Cloranfenicol

CLSI “Clinical and Laboratory Standards Institute” Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais

CPM Cefepime

CRO Ceftriaxona

DGGE Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DNA Ácido desoxirribonucléico

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

FAO “Food and Agriculture Organization” Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

GEN Gentamicina

HTS “High Throughput Sequencing” – Sequenciamento de alto rendimento

IMP Imipenem

LEV Levofloxacino

MAPA Ministério da Agricultura e Pecuária

MDR Multirresistência

MPM Meropenem

OIE Organização Mundial da Saúde Animal

OMS Organização Mundial de Saúde

ORF “Open reading frames” – Quadro aberto de leitura

OTU “Operational taxonomic unit” – Unidades taxonômicas operacionais

PAN-BR Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil

PCoA Principal Coordinate Analysis

PCR Reação em cadeia da polimerase

PDR “Pan Drug-Resistant” Pan-Resistente à Drogas

PIT Piperacilina/Tazobactam

QMF Queijo Minas Frescal

RAM Resistência aos antimicrobianos

REP “Repetitive Extragenic Palindromic” – Palindrômico Extragênico Repetitivo

RNA Ácido ribonucléico

16S rRNA 16S RNA ribossômico

RNA_m RNA mensageiro

RNA_r RNA ribossômico

RNA_t RNA transportador

RND Resistance nodulation division

RPM Rotações por minuto

SIF Selo de Inspeção Federal

SUT Sulfazotrim

TAE Tris-Acetato-EDTA

TBE Tris-Borato-EDTA

TE Tris-EDTA

TET Tetraciclina

TSI “Triple Sugar Iron” Ágar Tríplice Açúcar Ferro

UFC Unidade Formadora de Colônia

UFJF Universidade Federal de Juiz de Fora

UV Ultra Violeta

WGS “Whole Genome Sequencing” – Sequenciamento do genoma completo

XDR “Extensively Drug-Resistant” Extensivamente Resistente à Drogas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Queijos: produção e consumo	16
2.2 Queijo Minas Frescal (QMF).....	17
2.2.1 Processo de produção do QMF.....	18
2.2.2 Vias de contaminação e impactos sobre a microbiota do QMF.....	20
2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos	23
2.3.1 Principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação	23
2.3.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	25
2.3.3 Abordagem da resistência bacteriana no contexto de saúde única.....	29
2.3.4 Bactérias resistentes aos antimicrobianos veiculadas por alimentos...	31
2.3.5 Transmissão de genes de resistência: papel dos integrons de classe 1.....	34
2.4 Abordagens de sequenciamento para o estudo da microbiota dos queijos.....	36
2.4.1 Sequenciamento da microbiota: relevância para a segurança dos alimentos.....	36
2.4.2 Sequenciamento completo de genoma: vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias veiculadas por alimentos.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Parte 1.....	40
3.1.1 Objetivo geral.....	40
3.1.2 Objetivos específicos	40
3.2 Parte 2.....	40
3.2.1 Objetivo geral.....	40
3.2.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Delineamento Experimental.....	42
4.2 Parte 1.....	43
4.2.1 Processamento das amostras e extração de DNA total	43
4.2.2 Preparação da biblioteca e sequenciamento de <i>amplicons</i> do rRNA 16s.....	43
4.2.3 Análise de dados.....	44

4.3 Parte 2	46
4.3.1 Isolamento de bastonetes Gram-negativo.....	46
4.3.2 Identificação presuntiva de bastonetes Gram-negativos.....	47
4.3.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	47
4.3.4 Extração de DNA e detecção de integron de classe 1	48
4.3.5 Sequenciamento completo do genoma.....	50
4.3.6 Análises preliminares de dados genômicos.....	50
5. RESULTADOS	52
5.1 Parte 1	52
5.1.1 Sequenciamento e estimativas de diversidade	52
5.1.2 Perfil taxonômico das amostras de Queijo Minas Frescal (QMF).....	54
5.1.3 Microbiota central comum (“core”).....	57
5.2 Parte 2	59
5.2.1 Caracterização dos morfotipos bacterianos	59
5.2.2 Identificação presuntiva dos bastonetes Gram-negativos	59
5.2.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e detecção de integron de classe 1	61
5.2.4 Análises genômicas preliminares.....	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A	99

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um produto lácteo que tem desempenhado um papel importante no comportamento alimentar humano e, no Brasil, o mercado de queijo representa um importante potencial socioeconômico. Dentre os queijos não processados, destaca-se o Queijo Minas Frescal (QMF), um queijo fresco popular tradicional amplamente produzido e comercializado no Brasil. O QMF é produzido por coagulação enzimática de leite cru ou pasteurizado usando coalho ou coagulante, com ou sem culturas iniciadoras. Devido ao alto teor de umidade, pH acima de 5,0, baixa concentração de sal, ausência de culturas iniciadoras definidas e manipulação excessiva durante a fabricação, o QMF é um alimento favorável para o crescimento de microrganismos putativos contaminantes, torna-o um produto altamente perecível.

A microbiota dos produtos lácteos é altamente diversificada, e com relação à qualidade microbiológica dos queijos, sua caracterização pode fornecer conhecimento sobre questões higiênico-sanitárias e de segurança dos alimentos. Apesar dos valores econômicos e culturais do QMF, as comunidades microbianas associadas a esse tipo de queijo ainda são insuficientemente caracterizadas e, tradicionalmente, tem sido estudada através de técnicas baseadas em cultura. Considerando a qualidade microbiológica e questões higiênico-sanitárias, a maioria dos estudos busca a ocorrência de microrganismos indicadores específicos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., coliformes e *Staphylococcus* coagulase-positivo. Métodos independentes de cultura baseados em técnicas de *fingerprint* (impressão digital), como reação em cadeia da polimerase (PCR) associado a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE), também foram aplicados à investigação da diversidade bacteriana no QMF. No entanto, esses métodos não fornecem uma cobertura abrangente das populações microbianas.

O desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de alto rendimento (*High Throughput Sequencing* - HTS) impactou o campo da ecologia microbiana. A aplicação dessa metodologia ganhou atenção crescente devido ao seu potencial de fornecer novas informações sobre a complexidade microbiana de diversos ambientes, incluindo água, solo e intestino humano. As abordagens baseadas no HTS também foram usadas para investigar e entender as comunidades e a dinâmica microbiana em uma variedade de alimentos fermentados, incluindo diferentes queijos tradicionais, fornecendo informações valiosas relativas à influência da geografia, processos de

fabricação, condições higiênico-sanitárias, variação sazonal, e uso de leite cru ou pasteurizado. Esses estudos também levaram à identificação de bactérias anteriormente negligenciadas e deterioradoras de queijos.

Embora a legislação sanitária considere a presença de grupos microbianos específicos como indicadores de segurança e qualidade dos queijos, outros grupos que até então eram negligenciados na cadeia de produção alimentar, estão se tornando preocupantes com o crescimento do fenômeno da resistência antimicrobiana. Em uma perspectiva ecológica, o conhecimento sobre o papel do QMF como reservatório de bactérias putativas resistentes aos antimicrobianos tem crescido, à medida que a rápida disseminação de genes de resistência ganha visibilidade na abordagem de Saúde Única (*One Health*). Essa abordagem envolve a necessidade de uma visão e gestão integrativa, considerando a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente. A prevenção e o controle da resistência aos antimicrobianos (RAM) também vêm sendo tratados no contexto mundial e nacional por meio dessa abordagem, sendo que uma das estratégias é estabelecer o monitoramento de microrganismos resistentes nos alimentos disponíveis nos estabelecimentos comerciais. Apesar disso, ainda existe uma grande lacuna a respeito da regulamentação sanitária no que tange a potenciais vias de transmissão dessas bactérias resistentes através dos alimentos, incluindo o QMF.

O controle da RAM e a prevenção da propagação de microrganismos resistentes requerem primeiramente a compreensão dos mecanismos de resistência, das vias de transmissão e da epidemiologia desses microrganismos. Devido ao declínio contínuo nos custos associados e a crescente disponibilidade de ferramentas de bioinformática, o sequenciamento do genoma completo (*whole genome sequencing* - WGS) tem se tornado uma ferramenta útil para vigilância de RAM em bactérias veiculadas por alimentos, fornecendo uma maior compreensão da veiculação dessas bactérias e de genes de resistência em toda a cadeia de produção alimentar. O uso de WGS pode ampliar a descrição do perfil de resistência dos microrganismos, conforme tradicionalmente fornecido por testes de sensibilidade fenotípicos, fornecendo também informações sobre a ocorrência de genes de resistência, bem como a presença de elementos genéticos que possibilitem sua mobilização.

Em trabalho anterior, o resistoma clínico do QMF foi avaliado por PCR convencional a partir de DNA metagenômico, destacando esses alimentos como

importante reservatório de marcadores genéticos relacionada a resistência antimicrobiana e integrons de classe 1. Considerando a relevância econômica e cultural do QMF, bem como a lacuna de conhecimento científico ainda existente sobre sua microbiota, este trabalho teve como objetivos: contribuir para o entendimento sobre microbiota do QMF, estabelecendo a identidade das populações bacterianas dominantes através do HTS do gene *16S rRNA*; suscitar discussão sobre o papel de QMF na epidemiologia da resistência antimicrobiana, em continuidade a essa linha já em investigação pelo grupo de pesquisa, avaliando a ocorrência de bastonetes Gram negativos resistentes aos antimicrobianos e portadores de integrons de classe 1, bem como determinantes do seu genoma associados a resistência antimicrobiana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queijos: produção e consumo

O queijo é uma fonte rica em nutrientes essenciais, em particular, proteínas, peptídeos bioativos, aminoácidos, gorduras, ácidos graxos, vitaminas e minerais, o que o torna um dos alimentos mais nutritivos que se conhece (WHALTER *et al.*, 2008). O queijo tem uma longa história na dieta humana e é um dos produtos lácteos mais consumidos no mundo. Ao longo do tempo, sofreu diversas adaptações da técnica de elaboração, gerando uma grande diversidade de tipos de queijos existentes (ALVES, 2010). Sua classificação fundamenta-se em características decorrentes do tipo de leite utilizado, do tipo de coagulação, da consistência, do teor de gordura, do teor de umidade, do tempo de maturação, entre outros fatores (PERRY, 2004). Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido de massa coagulada de leite, parcialmente dessorada, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, podendo estes serem consumidos frescos, logo após sua fabricação, ou após período de maturação em que alterações bioquímicas e físicas proporcionam características próprias de sua variedade (MAPA, 1996).

Os queijos representam grande parte do mercado nacional de lácteos, sendo que aproximadamente 35% da produção de leite é transformada em queijo no Brasil (ABIQ, 2022). No Brasil há cerca de 2.000 laticínios com registro no Serviços de Inspeção Federal (SIF) e outro número expressivo respondendo pela produção artesanal ou até mesmo informal (EMBRAPA, 2021). A existência de um grande número de pequenos e micro laticínios que atuam regionalmente e fora do âmbito do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) dificultam a obtenção de informações oficiais sobre a produção total de queijos no Brasil (SEBRAE, 2008). Estima-se que em 2022, a produção de queijo no Brasil foi cerca de 745 mil toneladas, ocupando o 4º lugar na produção mundial, atrás da União Europeia (10.500 toneladas), Estados Unidos (6.379 toneladas) e Rússia (1.085 toneladas) (USDA, 2023).

Com relação ao consumo, os Estados Unidos (com 6,1 milhões de toneladas por ano) representa o maior país consumidor de queijo no mundo, respondendo por 24% do volume total. O segundo maior consumidor é a Alemanha (com 3 milhões de

toneladas) e a terceira posição é ocupada pela França (com 1,6 milhões de toneladas). (ABIQ, 2021). Em 2019 o Brasil ocupou a quarta colocação como maior consumidor, atrás dos países da União Europeia, Estados Unidos e Rússia, apresentando um consumo de 1,12 milhões de toneladas (ABIQ, 2021). Esse consumo representa cerca de 5,31 kg/habitante/ano e embora seja um consumo expressivo, ainda é inferior ao consumo per capita (em kg/habitante/ano) de outros países, como Argentina (11 kg habitante/ano) e países europeus, onde o consumo ultrapassa, em média, 20 kg por habitante/ano (CHAVES *et al.*, 2021; ABIQ, 2022). A Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) estabeleceu a meta de aumento do consumo para 2030, atingindo 9,6 kg de queijo por habitante/ano, por meio de inovações e parcerias com produtores de leite no Brasil (MILKPOINT, 2017).

A diversificação dos tipos de queijos produzidos pelo país foi acentuada nas três últimas décadas. O queijo tipo muçarela está na preferência do consumidor, principalmente pela intensa utilização em *food service* e na cozinha doméstica. Depois dele, a preferência se distribui entre queijo Minas Frescal, queijo Prato, queijo Coalho e tipo Parmesão. O restante, é composto pelos chamados queijos finos ou especiais (EMBRAPA, 2021).

2.2 Queijo Minas Frescal (QMF)

Os queijos frescos são produzidos mundialmente, e no Brasil, esse tipo de queijo é denominado Minas Frescal. É considerado um dos queijos mais populares e acredita-se que tenha sido o primeiro tipo de queijo fabricado no país, desde o período colonial, com a vinda de famílias portuguesas para a região de Minas Gerais (PEREIRA, 2007; FURTADO, 2017).

De acordo com a legislação vigente, entende-se por QMF o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (MAPA, 1997). É classificado como um queijo semigordo, de muito alta umidade (55 a 58%), pH 6,6-6,8 e baixo teor de sal (1,4% a 1,6%). Nenhum conservante é adicionado, de modo que a vida útil é de 15 a 20 dias sob refrigeração (MAPA, 1996; MAPA, 1997; MAPA, 2004).

Por se tratar de um produto semigordo com baixo teor de gordura saturada e fonte de proteína de alta digestibilidade, é um queijo frequentemente consumido em

dietas com restrição calórica para perda de peso (NUNES *et al.*, 2016). Além disso, o QMF pode ser considerado um alimento funcional quando bactérias lácticas são utilizadas na fabricação devido aos seus benefícios à saúde (ALMEIDA, TAMIME e OLIVEIRA, 2008).

O QMF é um dos queijos mais produzidos no Brasil, devido ao seu alto rendimento, custo de produção relativamente baixo e fácil processo de fabricação (DANTAS *et al.*, 2016). Sua fabricação pode ocorrer em fábricas de laticínios, mas também é comumente fabricado por pequenos produtores (NUNES *et al.*, 2016). O QMF deve atender aos requisitos de qualidade e identidade preconizados pela Portaria nº 146 do MAPA, onde sua produção deve ser feita a partir de leite pasteurizado, em indústria de laticínios ou queijaria, com algum serviço de inspeção (MAPA, 1996).

2.2.1 Processo de produção do QMF

A produção do QMF fabricado em indústrias de laticínios prevê a realização de diferentes etapas tecnológicas (Figura 1), embora algumas diversificações possam ser observadas nas linhas de produção de diferentes indústrias. De forma geral, após a pasteurização do leite, são adicionados o fermento, cloreto de cálcio e o coalho para coagular a caseína e gerar a massa do queijo, denominada coalhada (EMBRAPA, 2005).

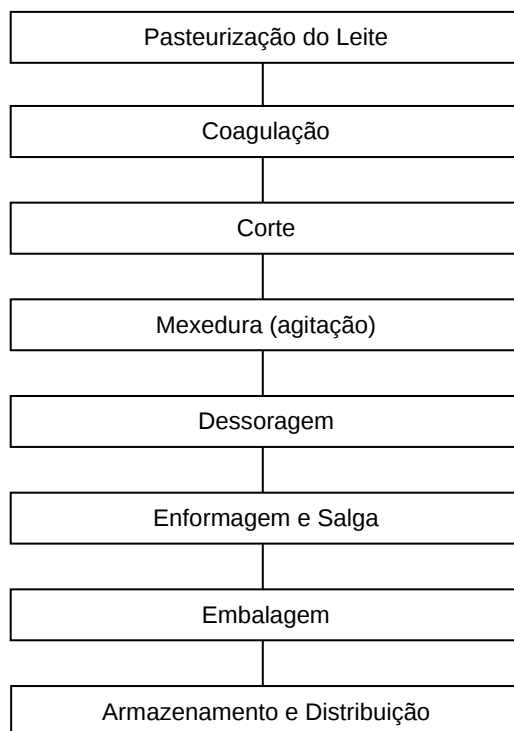


Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal. Fonte: Adaptado de PIAZZON GOMES, PRUDÊNCIO e SILVA, 2010

O fermento lácteo opcionalmente adicionado é uma cultura láctica selecionada, cujo objetivo é a produção de ácido láctico, o que reduz o risco de contaminação por diminuir e manter o pH ácido. Além disso, as etapas de formação da coagulada e retirada do soro também são otimizadas com o pH ácido. Para a fabricação do QMF, o fermento comumente utilizado é constituído pelas bactérias mesófilas *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*, as quais são denominadas *culturas starter* (EMBRAPA, 2005; JAY, 2005). Alternativamente a esse processo tradicional, onde bactérias lácticas específicas são adicionadas para produzir ácido láctico, a cultura láctica é substituída pela adição de ácido láctico industrial, chamado de processo de acidificação direta, para aumentar o rendimento do QMF e reduzir as alterações físico-químicas e microbiológicas durante sua vida útil (FURTADO, SOUZA e MUNCK, 1980).

A adição de cloreto de cálcio durante a produção do queijo é necessária, pois durante o processo de pasteurização, o teor de cálcio solúvel no leite é reduzido. O cloreto de cálcio contribui para acelerar a coagulação do leite, além de dar elasticidade à massa do queijo (ROCHA, 2004). O coalho adicionado ao leite é o composto que promove a sua coagulação, formando a massa do queijo. Este processo inicia-se após a adição do coalho e, em geral, o tempo necessário é cerca de 45 minutos. O final da

coagulação inicia-se com a determinação do ponto de corte da coalhada e, a partir disso, começa o tratamento da massa (EMBRAPA, 2005).

A massa pronta é cortada com a lira, utensílio com lâminas dispostas paralelamente, de forma a deixá-la em vários cubos e possibilitar a retirada do soro. Após a saída do soro, os cubos são agitados por 1 minuto e deixados em repouso durante 3 minutos, processo que se repete por 30 minutos. Após esse período, o queijo é enformado, sendo moldado na sua forma característica. Durante a enformagem, são realizadas viragens, e a cada viragem, é dado acabamento ao queijo, retirando as saliências das quinas. Com o queijo enformado, é feita a salga, que garante o controle de umidade, a conservação e o sabor. Alternativamente, o processo de salga também pode ser feito diretamente no leite ou na massa. Finalmente, o queijo é embalado geralmente em sacos de plástico e armazenado em baixas temperaturas para garantir sua conservação (EMBRAPA, 2005; SILVA, BORTOLUCI e VIVAN, 2019).

2.2.2 Vias de contaminação e impactos sobre a microbiota do QMF

A produção do QMF apresenta muitas vulnerabilidades, exigindo maior grau de atenção no que se refere as boas práticas de fabricação para garantir que o produto atenda a todos os parâmetros de qualidade e segurança ao chegar ao consumidor. Algumas características inerentes ao QMF o tornam um produto propício a contaminações, como pH acima de 5,0, baixo teor de sal (1,4 – 1,6 %), ausência de conservantes, elevada umidade, ausência de uma microbiota láctica competitiva e abundante (FURTADO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2016). A contaminação pode ocorrer desde antes do início do processo produtivo, devido às condições sanitárias do rebanho e à qualidade do leite; durante o processo de produção, devido à falta de condições higiênico-sanitárias dos trabalhadores e equipamentos utilizados; ou após o processamento, durante o transporte, armazenamento e comercialização (ROCHA, BUTITI e SAAD, 2006; NUNES *et al.*, 2016).

A qualidade da matéria prima utilizada para fabricação do queijo impacta diretamente na qualidade microbiológica do produto final. A microbiota inicial do leite *in natura* terá uma influência direta na qualidade do leite pasteurizado, e consequentemente, no queijo produzido a partir dele. O pH do leite, a temperatura de saída do úbere (cerca de 38°C), o seu valor nutricional, além do emprego de

operações manuais, são fatores que o tornam um alimento propício ao crescimento microbiano (MURPHY *et al.*, 2016; TILOCCA *et al.*, 2020). É durante a ordenha que as contaminações se iniciam, caso não sejam adotadas medidas preventivas. Os principais problemas estão associados a deficiência na limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, falta de higiene do ordenhador e resfriamento inadequado do leite (ROCHA, BUTITI e SAAD, 2006; MENEZES *et al.*, 2014). Quando sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária de um animal saudável, o leite é estéril, mas ao ser retirado, manipulado e armazenado, pode contaminar-se com microrganismos provenientes do interior da glândula mamária, da superfície dos tetos e úbere, dos equipamentos diversos utilizados e de várias outras fontes ambientais (BRITO, ARCURI e BRITO, 2000).

Para a efetiva fabricação industrial do queijo, o leite deve ser pasteurizado, com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos em atendimento a legislação vigente. No entanto, durante o processo produtivo ainda pode ocorrer a contaminação pós pasteurização (SILVA *et al.*, 2017). Os queijos são, em geral, produtos com alto grau de manipulação, principalmente nas etapas de enformagem e viragem, e por este motivo, passíveis de contaminação microbiológica caso não haja emprego das boas práticas de fabricação (PINTO *et al.*, 2009).

Além disso, a fabricação do QMF, de modo geral, requer a utilização de uma diversidade de equipamentos e utensílios, como tanques de coagulação, mesa de enformagem, agitadores, liras e formas, que também podem representar fontes de contaminação. As superfícies de processamento podem atuar como reservatórios de bactérias deteriorantes, potencialmente patogênicas e resistentes a antimicrobianos, gerando impacto sobre a qualidade e segurança dos alimentos (MØRETRØ e LANGSRUD, 2017). Utilizando metodologia independente de cultivo, Abreu e colaboradores (2021) detectaram a presença de diversos grupos microbianos associados a contaminação em amostras de *swabs* provenientes de manipuladores, do ambiente e de equipamentos (lira, piso, mesa, câmara fria, molde, ralos, tábuas, tanques) utilizados na produção de QMF.

O QMF é caracterizado por ser um produto perecível e com vida de prateleira curta, geralmente com validade de 15 a 20 dias, podendo sofrer alterações durante o período de armazenamento. Por isso, as temperaturas de refrigeração e condições adequadas de estocagem também estão diretamente relacionadas a qualidade do produto final (GOMES, FRANCO e MARTINIS, 2013). A própria embalagem do QMF

pode ser uma fonte potencial de contaminação durante o seu armazenamento. Carvalho e colaboradores (2021) demonstraram que *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de crescer e formar biofilme na embalagem do QMF na presença de soro, mesmo quando armazenado a 5°C. Além disso, as células bacterianas podem se desprender da embalagem, aumentando a carga microbiana do produto (CARVALHO *et al.*, 2021).

A qualidade microbiológica dos alimentos é avaliada pela presença de alguns microrganismos indicadores, os quais apontam para riscos de contaminações e levantam questões sobre as condições higiênico-sanitárias do processamento, da produção e do armazenamento. Os coliformes totais e os termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* destacam-se dentre os principais microrganismos indicadores em queijos (FREITAS *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014). A Instrução Normativa (IN) nº 161, de 01 de julho de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022), preconiza que os queijos de muito alta umidade (> 55%), como o QMF, devem respeitar os seguintes critérios e padrões microbiológicos: ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em 25g, número mais provável por grama de coliformes inferior a 10^3 (NMP/g) e 10^3 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase positivo.

Apesar da existência de parâmetros microbiológicos, muitos estudos têm relatado o isolamento e identificação desses microrganismos em amostras de QMF (FREITAS *et al.*, 2013; APOLINÁRIO, SANTOS e LAVORATO 2014; NUNES *et al.*, 2016). Apolinário, Santos e Lavorato (2014), avaliaram a presença de coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positivo e *L. monocytogenes* em QMF de indústrias fiscalizadas pelo serviço de inspeção federal, estadual e municipal. Na totalidade, 80% das amostras se apresentaram impróprias para consumo, com contagens acima do preconizado pela legislação para coliformes totais, coliformes termotolerantes, estafilococos e *L. monocytogenes*. Dias e colaboradores (2016), observaram que 70% e 100% das amostras de QMF avaliadas apresentaram contagem acima do limite máximo permitido para coliformes termotolerantes e totais, respectivamente. Essas observações sugerem a utilização de matéria prima de má qualidade e/ou falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do produto.

Embora a legislação sanitária atual considere a presença de grupos microbianos específicos como indicadores de segurança e qualidade, outros grupos considerados potencialmente patogênicos muitas vezes são negligenciados (FONTES *et al.*, 2013; RESENDE *et al.*, 2018). A ocorrência de gêneros como *Klebsiella*, *Morganella*, *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* na cadeia de produção alimentar pode representar um risco subestimado, especialmente considerando-se o crescimento da resistência aos antimicrobianos (RAM) (JONNALA *et al.*, 2018; QUINTIERI, FANELLI, e CAPUTO, 2019).

2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

2.3.1 Principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação

Os agentes antimicrobianos são complexos sintéticos, semissintéticos ou naturais que interferem em processos específicos essenciais para o crescimento e divisão da célula bacteriana, seja por atividade bactericida ou bacteriostática (WALSH, 2003; ABUSHAHEEN *et al.*, 2020). Eles podem ser separados em classes de acordo com os mecanismos de ação, que estão relacionados principalmente a: inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese de proteínas; inibição da síntese de ácido nucleico e inibição de vias metabólicas e enzimas bacterianas (Tabela 1).

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais antimicrobianos

Classe	Mecanismo de ação	Exemplos
β -lactâmicos	Inibição da síntese da parede celular	• Penicilinas: Penicilina, penicilina G, ampicilina, piperacilina, oxacilina, metilicilina, • Cefalosporinas: Cefazolina, Cefalotina, Cefalexina, Cefaclor, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefepime, Cefoxitina, • Monobactâmicos: Aztreonam • Carbapenêmicos: Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Doripenem
Glicopeptídeos	Inibição da síntese da parede celular	Vancomicina, Teicoplanina
Aminoglicosídeos	Inibição da síntese de proteína	Amicacina, gentamicina, canamicina, estreptomicina, tobramicina
Tetraciclina	Inibição da síntese de proteína	Doxiciclina, minociclina, tetraciclina
Fenicóis	Inibição da síntese de proteína	Clorafenicol
Quinolonas e Fluoroquinolonas	Inibição da síntese de ácido nucléico	Ácido nalidíxico, norfloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino
Inibidores da via folato	Inibição metabólica	Sulfonamidas, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol

Fonte: adaptado de Koneman et. al, 2014, Levy e Marshall, 2004 e Reygaert, 2018

Os β -lactâmicos são os agentes antimicrobianos mais frequentemente prescritos devido a sua segurança, eficácia e espectro de ação (BUSH e BRADFORD, 2020). Esses antimicrobianos são caracterizados pela presença do anel β -lactâmico, responsável pela ação antimicrobiana, e podem ser classificados em 4 grupos segundo a ligação do anel β -lactâmico a estruturas adjacentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Tabela 1). De forma geral, agem ligando-se de forma irreversível às proteínas ligadoras de penicilina (PBP) necessárias para a etapa final da síntese de peptídeoglicano, o que impede a construção da parede celular bacteriana (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017). As demais classes de antimicrobianos estão englobadas no grupo dos antimicrobianos não β -lactâmicos, compreendendo os aminoglicosídeos, as tetraciclina, as fluoroquinolonas e quinolonas, os inibidores de folato e os fenicóis (ANDRADE e DARINI, 2017).

Os antimicrobianos envolvidos na inibição da síntese de proteínas, como os aminoglicosídeos e tetraciclina, atuam interagindo com as subunidades 30S ou 50S do ribossomo bacteriano, bloqueando a ligação do RNA transportador (RNAt), levando a leitura incorreta e término prematuro da tradução do RNA mensageiro (RNAm) (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017). A inibição da síntese proteica interrompe ou retarda o crescimento da célula bacteriana.

O comprometimento da síntese de ácido nucléico bacteriano está relacionado ao efeito inibitório que as quinolonas e fluoroquinolonas exercem sobre as enzimas DNA girase e topoisomerasas, cruciais nas etapas de início da replicação e enovelamento do DNA. A inativação dessas enzimas leva a formação anormal de DNA, quebra da fita dupla de sua estrutura e, conseqüentemente, morte celular. Dentre outros antimicrobianos de importância clínica, destaca-se também a Polimixina B e Colistina, cujo principal mecanismo de ação envolve a ruptura e/ou permeabilização da membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020).

2.3.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são uma das classes mais significativas de produtos farmacêuticos e uma das descobertas médicas mais influentes do século XX, representando um marco histórico (DAVIES e DAVIES, 2010). Uma nova era no

tratamento de doenças infecciosas abriu-se com a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming, em 1928. Entre as décadas de 1940 e 1970, a descoberta de outros antimicrobianos como estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina logo se seguiu, e esse período foi conhecido como a “era de ouro” dos antibióticos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Como resultado desse sucesso inicial, as doenças bacterianas foram ingenuamente consideradas como permanentemente eliminadas (PENESYAN GILLINGS e PAULSEN, 2015; LEKSHMI *et al.*, 2017). No entanto, a observação de bactérias apresentando resistência aos efeitos inibitórios dos antibióticos tornou-se cada vez mais comum. Consequentemente, a eficácia inicial dos antibióticos foi comprometida, à medida que sua introdução e uso disseminado selecionava variantes que possuíam mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos (VERRAES *et al.*, 2013).

A resistência intrínseca está relacionada a existência de características estruturais ou funcionais únicas de alguns grupos bacterianos que proporcionam resistência a certos antimicrobianos (KOSTYANEV e CAN, 2017). Essa resistência intrínseca pode ser devido à ausência de parede celular, como ocorre em *Mycoplasma spp* e espécies relacionadas, tornando-as resistentes a todos os medicamentos que têm como alvo a parede celular, incluindo β -lactâmicos e glicopeptídeos. A barreira de permeabilidade exercida pela presença de membrana externa e extrusão do antimicrobiano pela presença natural de bombas de efluxo codificadas cromossomicamente também são mecanismos comuns de resistência intrínseca (PETERSON e KAUR, 2019; ABUSHAHEEN, *et al.*, 2020). Diferentes gêneros, espécies ou linhagens exibem perfis fenotípicos de resposta a antimicrobianos. Na prática, o conhecimento da resistência intrínseca de um patógeno é essencial para evitar terapia antimicrobiana inadequada (UDDIN *et al.*, 2021).

Por outro lado, algumas bactérias naturalmente susceptíveis podem obter a capacidade de resistir à atividade de um determinado agente antimicrobiano como resultado de mutações ou através da aquisição de genes via transferência horizontal. Os mecanismos de transferência horizontal de genes de resistência incluem transformação, conjugação e transdução, dos quais a conjugação é o modo mais importante e amplamente encontrado em bactérias (KOSTYANEV e CAN, 2017; REYGAERT, 2018). A conjugação envolve transferência de material genético de uma bactéria doadora para uma bactéria receptora por meio do contato físico direto entre células. Na transformação, o DNA extracelular de bactérias doadoras lisadas é

absorvido por bactérias receptoras, e no processo de transdução, um bacteriófago atua como transportador de DNA cromossômico e extracromossômico de uma bactéria doadora para a bactéria receptora (TAO *et al.*, 2022). A transferência horizontal de genes é mediada por elementos genéticos móveis, que promovem a mobilidade do DNA intracelular (do cromossomo a um plasmídeo ou entre plasmídeos), bem como aqueles que permitem a mobilidade do DNA intercelular (PARTRIDGE *et al.*, 2018). Muitos genes que conferem resistência aos antimicrobianos são encontrados nesses elementos genéticos móveis, que incluem as sequências de inserção, transposons, integrons e plasmídeos, permitindo a ampla disseminação de múltiplos genes de resistência (GILLINGS, 2013; PERRY e WRIGHT, 2013; PARTRIDGE *et al.*, 2018).

De forma geral, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos enquadram-se em quatro categorias principais: inativação do antimicrobiano, alteração no alvo do antimicrobiano, superexpressão de sistemas de efluxo e alterações na permeabilidade celular (REYGAERT, 2018).

Os dois principais mecanismos pelos quais as bactérias inativam os antimicrobianos é pela sua degradação enzimática ou pela transferência de um grupo químico que modifica sua estrutura. As β -lactamases, enzimas altamente diversificadas com diferentes espectros de atividade, são capazes de hidrolisar o anel dos β -lactâmicos, sendo este o principal mecanismo envolvido na resistência bacteriana a essa classe de antimicrobiano (ARZANLOU, CHAI e VENTER, 2017; ABUSHAHEEN *et al.*, 2020). A inativação por transferência de um grupo químico, mais comumente os grupos acetil, fosforil e adenil, impede que o antimicrobiano se ligue à sua proteína alvo como resultado de um impedimento estérico. Os aminoglicosídeos são particularmente susceptíveis à essa modificação, pois tendem a ser moléculas grandes com muitos grupos hidroxila e amida expostos (BLAIR *et al.*, 2015; REYGAERT, 2018)

Alterações na estrutura alvo que impedem a ligação eficiente do antibiótico, mas que ainda permitem que o alvo desempenhe a sua função normal na célula bacteriana, também podem conferir resistência (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020). Um dos mecanismos de resistência aos medicamentos β -lactâmicos envolve alterações na estrutura e/ou número de proteínas ligadoras de penicilinas. A resistência a antimicrobianos que têm como alvo as subunidades ribossômicas, como os aminoglicosídeos e tetraciclinas, pode ocorrer por meio de mutação ribossômica ou

metilação da subunidade ribossômica (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017). Para medicamentos como fluoroquinolonas, que têm como alvo a síntese de ácido nucleico bacteriano, a resistência se dá por meio de modificações na DNA girase ou na topoisomerase, levando a incapacidade do antimicrobiano de se ligar a esses componentes (BLAIR *et al.*, 2015; REYGAERT, 2018).

As bombas de efluxo são proteínas que expõem os antimicrobianos da célula bacteriana, diminuindo assim sua concentração para níveis subinibitórios. São os principais contribuintes para a resistência intrínseca das bactérias Gram negativas, e quando superexpressas, também podem conferir resistência a antimicrobianos anteriormente eficazes (BLAIR *et al.*, 2015; ARZANLOU, CHAI e VENTER, 2017). O aumento da expressão de genes que codificam as bombas de efluxo pode estar relacionado a mutações na rede reguladora que controla a sua expressão ou como resultado da indução em resposta a sinais ambientais e em condições em que a sua função é necessária (REYGAERT, 2018). Uma característica importante é a sua capacidade de extrusar uma ampla variedade de compostos estruturalmente diferentes, resultando no desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas. Além disso, alguns genes que codificam as bombas de efluxo podem ser mobilizados em plasmídeos e, portanto, transferidos entre espécies (ARZANLOU, CHAI e VENTER, 2017).

Em comparação com as espécies Gram positivas, as bactérias Gram negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antimicrobianos, uma vez que a sua membrana externa forma uma barreira de permeabilidade (BLAIR *et al.*, 2015; ARZANLOU, CHAI e VENTER, 2017). Os antibióticos hidrofílicos atravessam a membrana externa difundindo-se através das proteínas da membrana externa, chamadas de porinas. A redução da permeabilidade da membrana externa e a limitação da entrada do antimicrobiano na célula bacteriana são alcançadas pela regulação negativa das porinas ou por mutações que alteram a seletividade do canal da porina, tornando-as mais seletivas (REYGAERT, 2018). Em *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., as reduções na expressão de porinas contribuem significativamente para a resistência a medicamentos como carbapenêmicos e cefalosporinas, aos quais a resistência é geralmente mediada pela degradação enzimática (BLAIR *et al.*, 2015).

2.3.3 Abordagem da resistência bacteriana no contexto de Saúde Única (*One Health*)

A resistência antimicrobiana põe em risco a eficácia da prevenção e do tratamento de um número cada vez maior de infecções. Novos mecanismos de resistência emergem e disseminam-se rapidamente, representando um problema de saúde pública global (O'NEILL, 2016; WALL, 2019). Estima-se que, em 2019, a resistência aos antimicrobianos causou 1,27 milhões de mortes diretamente e contribuiu indiretamente para 4,95 milhões de mortes em todo o mundo. No ritmo atual, estima-se que 10 milhões de pessoas morrerão durante o ano de 2050 como resultado da resistência aos antimicrobianos (MURRAY *et al.*, 2022). O surgimento de bactérias apresentando múltipla resistência revive memórias da era pré-antibiótica e levanta preocupações sobre uma possível era pós-antibiótica (LAMMIE e HUGHES, 2016).

Na etiologia multifacetada da resistência bacteriana aos antimicrobianos, as atividades humanas impulsionam a geração de reservatórios ambientais de genes associados a essa condição (DAVIES e DAVIES, 2010). Isso envolve uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos, diagnósticos tardios e ineficazes, prescrições inadequadas, falta de adesão do paciente ao tratamento e automedicação, más condições de higiene pública, fluxo contínuo de viajantes pelo mundo e uso de antimicrobianos de forma excessiva na agropecuária (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; VENTOLA, 2015; UDDIN *et al.*, 2021). Todos esses fatores exercem uma pressão seletiva e resultam no enriquecimento de determinantes de resistência nas populações bacterianas. Diante desse cenário, identificar os caminhos e os impulsionadores para a evolução da transmissão da resistência aos antimicrobianos é essencial para entender e gerenciar esse problema.

Sabe-se que os genes de resistência aos antimicrobianos não estão confinados no ambiente clínico, mas são amplamente distribuídos em diferentes populações bacterianas em diversos tipos de ambientes. Esses genes, através dos elementos genéticos móveis, circulam entre espécies bacterianas e são integrados à microbiota de seres humanos, animais, alimentos, esgoto, solo e ambientes aquáticos (MCEWEN e COLLIGNON, 2018; BAQUERO *et al.*, 2019). Nesse fluxo contínuo, os genes de resistência frequentemente se movem a partir de grupos não patogênicos para patogênicos, apresentando risco elevado à saúde humana. Essa atividade tem sido

um dos principais fatores na evolução de patógenos resistentes a antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2022).

A complexidade do desafio da resistência bacteriana aos antimicrobianos e a sua capacidade de impactar a saúde, a economia, a segurança alimentar e o meio ambiente em todo o mundo, exige um olhar sob a perspectiva de Saúde Única para o combate ao problema (LAMMIE e HUGHES, 2016; OGAWA *et al.*, 2019; ASLAM *et al.*, 2021). A abordagem de Saúde Única está relacionada a uma visão e gestão integrativa considerando a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente. O conceito não é novo, tendo sido promovido por Rudolf Virchow e outros no final do século XIX. Embora tenha recebido relativamente pouca atenção durante grande parte do século XX, nos últimos anos, o movimento Saúde Única gerou um interesse crescente na abordagem de questões de saúde pública, incluindo a resistência bacteriana aos antimicrobianos (LAMMIE e HUGHES, 2016; WIND *et al.*, 2021).

A prevenção e o controle da resistência aos antimicrobianos vêm sendo tratados no contexto mundial e nacional por meio da abordagem de Saúde Única, combinando abordagens de vigilância, relatórios e intervenções em ambientes humanos e veterinários (ASLAM *et al.*, 2021). O Brasil publicou, em 2018, o seu “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única” (PAN-BR). O PAN-BR define objetivos, intervenções estratégicas e atividades a serem executadas, de forma multidisciplinar, para o combate à RAM no país (MAPA, 2018). Uma das intervenções estratégicas preconizadas pelo PAN-BR, é estabelecer o monitoramento de microrganismos resistentes nos alimentos disponíveis nos estabelecimentos comerciais (MAPA, 2018). Embora essa ação esteja contemplada no plano nacional, programas específicos de vigilância de alimentos no varejo para determinar a exposição do consumidor a bactérias resistentes aos antimicrobianos via alimentos raramente são implementados de forma sistemática. A integração dos alimentos a nível retalhista contribuiria para a identificação de potenciais vias de transmissão dessas bactérias entre animais e humanos e permitiria uma maior otimização das estratégias de mitigação da RAM no âmbito do conceito *One Health* (JANS *et al.*, 2018).

2.3.4 Bactérias resistentes aos antimicrobianos veiculadas por alimentos

As bactérias associadas aos alimentos constituem um grupo heterogêneo e estendem-se a todos os nichos ecológicos onde são produzidos e manuseados alimentos para consumo humano. Esses ambientes incluem o solo, plantas, pecuária, animais, ecossistemas marinhos, peixes, aves selvagens e outros animais silvestres, ou áreas com impacto humano como indústrias de produção de alimentos, restaurantes, mercados ou efluentes de esgoto (FRIEDMAN, 2015). No entanto, um problema de saúde emergente que representa uma séria ameaça à saúde pública em todo o mundo é a resistência a antimicrobianos associado a essas bactérias.

A transmissão via alimentos é quantitativamente o modo mais importante de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos para o ser humano, especialmente se os padrões higiênico-sanitários apropriados não forem consistentemente aplicados em toda a cadeia alimentar, desde a fazenda até a mesa do consumidor (SAMTIYA *et al.*, 2022). A transmissão de bactérias resistentes aos antimicrobianos para o trato gastrointestinal humano é preocupante devido a infecções diretas ou à possibilidade de transferência horizontal de genes com outros membros potencialmente patogênicos da microbiota intestinal, favorecida pelas altas densidades celulares encontradas no intestino (COLLIGNON *et al.*, 2016; JANS *et al.*, 2018).

Alimentos de origem animal industrializados são uma fonte potencial de bactérias putativas e resistentes a antimicrobianos (KIRBIS e KRIZMAN, 2015; SAMTIYA *et al.*, 2022). *Escherichia coli*, por exemplo, embora seja uma espécie integrante da microbiota residente do intestino humano e animal, pode contaminar produtos alimentícios durante a evisceração animal no abate ou durante a manipulação de alimentos. Além disso, configurando um risco adicional, *E. coli* pode transferir genes de resistência para outras bactérias patogênicas no intestino (FAIRBROTHER e NADEAU, 2006; MARTINS e BEUTIN, 2011).

O principal meio para prevenir a transferência de bactérias resistentes aos antimicrobianos através da cadeia de produção alimentar é o mesmo que para os contaminantes e patógenos veiculados por alimentos: aplicação de boas práticas de higiene ao longo de todo o processo produtivo (CAPITA e ALONSO-CALLEJA, 2013). Os manipuladores de alimentos são frequentemente associados à disseminação de bactérias resistentes, condição resultante de más práticas de higiene ou

contaminação cruzada pelo manuseio de alimentos contaminados (SAMTIYA *et al.*, 2022). Estudos têm relatado o isolamento de bactérias resistentes aos antimicrobianos nas mãos de trabalhadores envolvidos na manipulação de alimentos em diferentes estabelecimentos, como restaurantes, feiras e cozinhas de hospitais (TAN, LEE e MAHYUDIN, 2014; SILVA *et al.*, 2015; CASTRO *et al.*, 2016). Através da caracterização fenotípica de linhagens de *E. coli* isoladas de manipuladores de QMF em um laticínio, Campos e colaboradores (2006) identificaram isolados bacterianos do nariz e das mãos com resistência a diferentes classes de antimicrobianos (CAMPOS *et al.*, 2006). Por isso, é importante a conscientização de trabalhadores envolvidos na manipulação na matéria prima, produção, processamento, fabricação, preparação e comércio de alimentos (KIRBIS e KRIZMAN, 2015; CASTRO *et al.*, 2016).

O uso de antimicrobianos em animais também tem um grande impacto na incidência de resistência a antimicrobianos em humanos. No Brasil, embora a proibição do uso de antimicrobianos importantes na medicina humana para promoção de crescimento de animais produtores de alimentos tenha sido determinada em diversas Instruções Normativas (MAPA, 2020), os antimicrobianos ainda são amplamente usados em animais de produção para prevenir e tratar doenças infecciosas. Sob pressão seletiva persistente, bactérias comensais no gado tornam-se reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos, e podem ser transmitidos através do consumo de carne e outros produtos de origem animal (por exemplo, leite e seus derivados) (CAPITA e ALONSO-CALLEJA, 2013; SABINO *et al.*, 2019; BLANCO-PICAZO *et al.*, 2022).

Estudos publicados relatam bactérias resistentes aos antimicrobianos associadas a diversos tipos de alimentos (VERRAES *et al.*, 2013; FRIEDMAN, 2015; JANS *et al.*, 2018; SAMTIYA *et al.*, 2022). Jans e colaboradores (2018) relataram que carne crua, leite, frutos do mar e produtos lácteos como o queijo, apresentaram alta prevalência de RAM em patógenos alimentares Gram-negativos e Gram-positivos veiculados por alimentos. A maior abundância relativa de amostras positivas para bactérias resistentes foi observada em produtos de carne, seguido por queijos (JANS *et al.*, 2018).

Os produtos lácteos, especialmente, podem ser considerados importantes veículos de disseminação de grupos bacterianos relevantes e seus marcadores de resistência aos antimicrobianos (DAMACENO *et al.*, 2015; FRAQUEZA, 2015).

Hassani e colaboradores (2022) relataram alta prevalência de contaminação do leite bovino com patógenos resistentes a antimicrobianos, como *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* (HASSANI et al., 2022). Genes de resistência aos antimicrobianos foram relatados em diferentes gêneros de bactérias lácticas (BAL) isoladas de produtos lácteos (ERGINKAYA, TURHAN e TATLI, 2018; WANG et al., 2019). Embora a maioria das linhagens de BAL não seja patogênica, os genes de resistência que abrigam podem ser disseminados para outros microrganismos (MATHUR e SINGH, 2005).

Nos queijos em particular, a resistência aos antimicrobianos já foi relatada em diversos estudos, utilizando abordagens variadas. Através do teste de susceptibilidade, utilizando o método de disco difusão (Kirby Bauer), um estudo demonstrou que 100% das amostras de queijos oferecidos em um hospital oncológico apresentaram microrganismos Gram-negativos resistentes a 5 antimicrobianos (ampicilina, ampicilina-sulbactam, gentamicina, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprima), de um total de 11 testados. Os antimicrobianos cloranfenicol e tetraciclina chegaram a totalizar resistência em 87,5% das amostras, seguido pelo ertapenem, que apresentou 75% (MELO et al., 2022). Em outro estudo realizado por Silva e colaboradores (2020), o teste de susceptibilidade com 10 discos de antimicrobianos diferentes revelou que 100% das amostras de QMF apresentaram microrganismos Gram negativos resistentes a 6 antimicrobianos (clorafenicol, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, ceftazidima, ampicilina e ampicilina-sulbactam). Além disso, esses microrganismos também apresentaram perfil de resistência ao ertapenem em 86,7% das amostras de queijos, à gentamicina em 66,7%, à cefepime em 46,7% e à ciprofloxacina em 33,3%.

Genes de resistência a antimicrobianos também já foram identificados tanto no DNA microbiano total, quanto em bactérias isoladas, utilizando metodologias de biologia molecular. Resende e colaboradores (2018) relataram a ocorrência de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, detectados em isolados bacterianos de amostras de QMF industrializados, produzidos em diferentes laticínios. Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, 19 marcadores de resistência a diferentes classes de antimicrobianos foram detectados por PCR em DNA metagenômico de amostras de QMF industrializados (PAULA et al., 2018). Outros estudos relataram genes que codificam resistência à tetraciclina, eritromicina, estreptomicina, aminoglicosídeos, cloranfenicol dentre outros (FLORÉZ et al., 2014;

FLÓREZ, VÁZQUEZ e MAYO, 2017). Além disso, através do sequenciamento do genoma, foi demonstrado que muitos desses genes são carregados por plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (FLORÉZ *et al.*, 2021).

2.3.5 Transmissão de genes de resistência: papel dos integrons de classe 1

Embora seja estimado que a maior parte da resistência adquirida aos antimicrobianos é mediada por plasmídeos (ALANIS, 2005), as bactérias também podem adquirir genes de resistência através da disseminação de transposons ou integrons. Os integrons representam uma classe importante de elementos genéticos, capazes de integrar genes de resistência a diversos antimicrobianos, expressá-los e disseminá-los entre as bactérias (CAMBRAY, GUEROUT e MAZEL, 2010). Os integrons tem sido detectados em mais de 15% de genomas bacterianos, onde geralmente se encontram em cromossomos, embora também sejam comumente transportados em plasmídeos. A história evolutiva dos integrons sugere que integrons cromossomais (IC) são transferidos para bactérias clinicamente relevantes através da sua associação com transposons e plasmídeos conjugativos. Isso permitiu a dispersão eficiente de integrons inter e intra-espécies, e assim, sua classificação como integrons móveis (IMs) (RAVI *et al.*, 2014; ESCUDERO, 2015; GILLINGS, 2017).

Os integrons são elementos genéticos capazes de capturar e expressar genes exógenos na forma de cassetes gênicos móveis. Eles possuem duas regiões estratégicas localizadas na região conservada 5' (5'CS) capazes de mobilizar e inserir cassetes: gene *intI*, que codifica uma recombinase sítio-específica, denominada integrase e a região *attI*, sítio onde a integrase catalisa a recombinação, inserção ou excisão dos cassetes gênicos. O segmento conservado de 3' (3'CS), região posterior aos cassetes gênicos inseridos, consiste nos genes *sul1* e *qacEΔ1*, os quais codificam resistência a sulfonamida e compostos de amônio quaternário, respectivamente (GILLINGS, 2014, DENG *et al.*, 2015; ESCUDERO *et al.*, 2015).

A região variável dos integrons inclui um ou mais cassetes gênicos (Figura 2). Os cassetes gênicos são pequenos elementos genéticos móveis capazes de integrar-se e excisar-se dos integrons. Os cassetes gênicos são unidades compostas por uma sequência de leitura seguida de um sítio de recombinação, chamado *attC*. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e o sítio *attC*. A recombinação de múltiplos cassetes com o sítio *attI* resulta na produção de arranjos que podem conter mais de

200 cassetes. Os cassetes gênicos não possuem um promotor, portanto, os integrons são essenciais para a transcrição desses genes. Este sistema de captura de genes permite a geração de complexidade genômica e aquisição de fenótipos adaptativos, incluindo resistência a quase todas as classes conhecidas de antimicrobianos (GILLINGS, 2014, DENG *et al.*, 2015; ESCUDERO *et al.*, 2015).

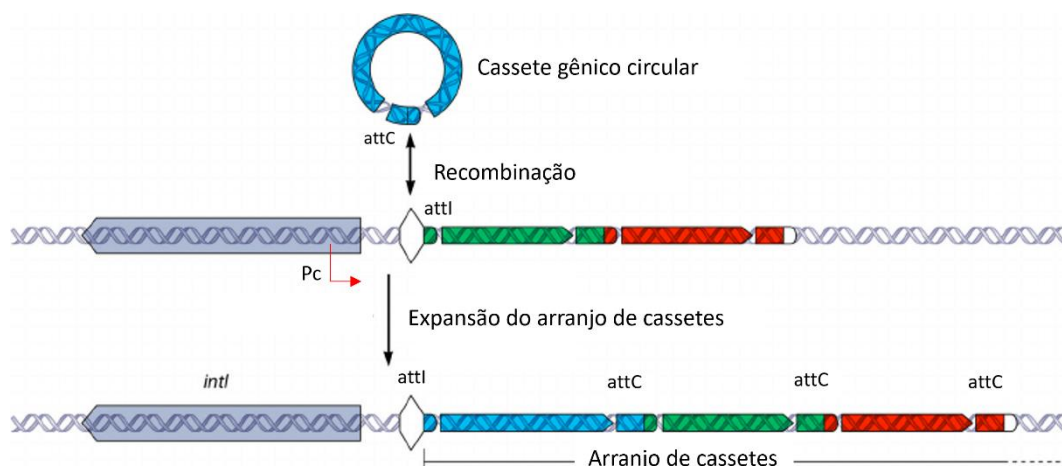


Figura 2. Estrutura do integron. A plataforma básica do integron consiste em: *intI*, um gene para a integrase; *Pc*, um promotor constitutivo; *attI*, um sítio de recombinação; e cassetes gênicos, inseridos sequencialmente através da recombinação entre o sítio *attI* e os locais de recombinação associados aos cassetes (*attC*). Fonte: Adaptado de Gillings, 2014.

Com base na diversidade das sequências do gene integrase, existem diversas classes de integrons em bactérias ambientais. Neste grupo diversificado, apenas algumas classes de integrons tornaram-se significativas em contextos clínicos, e destas, a classe 1 é a mais importante (GILLINGS *et al.*, 2015; GILLINGS, 2017). Segundo Gillings (2017), o caminho mais provável para o movimento de integrons de classe 1 de ambientes naturais para a microbiota humana é através da água ou de bactérias veiculadas por alimentos. Diversos estudos têm reportado a ocorrência de integrons de classe 1 em bactérias isoladas de diversos tipos de alimentos (JONES-DIAS *et al.*, 2016; GHALY *et al.*, 2017; REHMAN *et al.*, 2017). Estudo anterior do nosso grupo investigou a presença de genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos e de integrons de classes 1, 2 e 3 em amostras de QMF, de forma independente de cultivo, baseado em PCR qualitativo. Os resultados revelaram a presença de diversos genes de resistência, além da presença de integrons de classe 1 em 77% das amostras (PAULA *et al.*, 2018). Os resultados encontrados ratificam a

concepção de que os alimentos estão associados com a dispersão de integrons e outros determinantes de resistência. Entretanto, as técnicas utilizadas não permitem a caracterização da estrutura dos integrons e dos cassetes gênicos que podem transportar, além de não possibilitar a identificação dos grupos microbianos associados a presença deles.

2.4 Abordagens de sequenciamento para o estudo da microbiota dos queijos

2.4.1 Sequenciamento da microbiota: relevância para a segurança dos alimentos

Os queijos apresentam uma comunidade microbiana diversa e que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de suas propriedades sensoriais, composição de nutrientes, vida de prateleira e segurança (CHOI *et al.*, 2020; WALSH, *et al.*, 2020). Além disso, os queijos podem atuar como reservatório de bactérias potencialmente patogênicas e resistente aos antimicrobianos, configurando um risco ao consumidor. Portanto, compreender a composição desta microbiota e seu impacto na qualidade e segurança destes alimentos é de grande relevância (ERCOLINI, 2020).

Historicamente, técnicas de microbiologia baseadas em cultura foram usadas para obter uma compreensão da composição microbiana do queijo. No entanto, tornou-se cada vez mais claro que esta abordagem pode ser limitada em sua capacidade de detectar microrganismos “difíceis de cultivar” ou subdominantes (SEKSE *et al.*, 2017; REUBEN *et al.*, 2023). Por isso, as abordagens independentes de cultivo tornaram-se cada vez mais utilizadas. Essas abordagens envolvem métodos moleculares baseados no DNA e, ocasionalmente, no RNA, com o HTS ganhando atenção especial em virtude do seu potencial para fornecer uma visão da comunidade microbiana total do queijo (JONNALA *et al.*, 2018; WALSH, *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a aplicação do HTS tem contribuído para a caracterização da microbiota de diferentes queijos, fornecendo informações valiosas relativas à influência da geografia, processos de fabricação, condições higiênico-sanitárias, variação sazonal, uso de leite cru ou pasteurizado (ESCOBAR-ZEPEDA, SANCHEZ-FLORES e BARUCH, 2016; JIN *et al.*, 2018; CHOI *et al.*, 2020; ABREU *et al.*, 2021; TILOCCA *et al.*, 2022; REUBEN *et al.*, 2023). Dependendo da profundidade do sequenciamento, ele pode facilitar a detecção de táxons presentes em níveis baixos,

uma característica de grande valor no contexto microrganismos putativos, deteriorantes ou patogênicos. Essas informações podem ser aproveitadas pelos produtores para otimizar a qualidade, a segurança e o valor comercial de seus produtos (JONNALA *et al.*, 2018).

A aplicação do HTS para análise de comunidade microbiana pode envolver três abordagens primárias. No sequenciamento de *amplicon*, um fragmento de gene altamente conservado, idealmente com regiões variáveis nele, é usado para sequenciamento, em comparação com bancos de dados que permitem atribuição taxonômica. O gene 16S rRNA é mais frequentemente usado e fornece uma visão sobre a composição bacteriana das amostras (geralmente para o nível de gênero) (LIU *et al.*, 2021). O sequenciamento metagenômico Shotgun, envolve o sequenciamento não direcionado de todos os genomas microbianos presentes em uma amostra, podendo fornecer perfis de genes funcionais e alcançar uma resolução maior de anotação taxonômica (QUINCE *et al.*, 2017). Na metatranscriptômica (RNASeq), o mRNA total na amostra é sequenciado (após ser primeiro convertido em cDNA) para revelar a extensão em que diferentes genes são expressos e, por sua vez, a atividade relativa de diferentes componentes da comunidade. Esses três procedimentos experimentais diferem no que diz respeito à preparação da biblioteca, estratégia de sequenciamento e as abordagens adotadas para a análise bioinformática (JONNALA *et al.*, 2018). A figura 3 apresenta uma visão geral das diferentes abordagens de sequenciamento aplicáveis à microbiologia de alimentos (WALSH *et al.*, 2017).

Alguns dos resultados mais comuns dessas metodologias estão relacionados alfa (α) diversidade, beta (β) diversidade e à determinação da abundância relativa de diferentes táxons, possibilitando análises de comparações e correlações. A α diversidade é uma medida de diversidade, como o número total de espécies, dentro de uma amostra e normalmente, medidas como os índices de diversidade de Simpson e Shannon são empregadas. A diversidade β reflete as diferenças na diversidade em diferentes amostras, com Bray-Curtis e UniFrac entre as métricas de distância mais utilizadas (JONNALA *et al.*, 2018).

Embora existam muitas vantagens associadas ao uso do HTS, algumas barreiras, como a detecção de sequências de DNA de bactérias não viáveis, custo-benefício, e a experiência em análise bioinformática precisam ser superadas antes que esses

benefícios possam ser aplicados extensivamente em toda a indústria (SEKSE *et al.*, 2017; JONNALA *et al.*, 2018).

2.4.2 Sequenciamento completo de genoma: vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias veiculadas por alimentos

A possibilidade de veiculação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos através da cadeia de produção alimentar revela que esta é uma questão de segurança dos alimentos, o que torna fundamental a compreensão dos mecanismos de resistência, das vias de transmissão e da epidemiologia desses microrganismos (OMS, 2011; JANS *et al.*, 2018; ONICIUC *et al.*, 2018). A análise padronizada da suscetibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos baseia-se em diferentes testes fenotípicos de linhagens clínicas, ambientais e alimentares isoladas, como os métodos de micro e macrodiluição em caldo ou ensaios de difusão em disco (KAHLMETER *et al.*, 2013; NIHR, 2020). Esta abordagem, que determina se isolados bacterianos cultivados crescem *in vitro* na presença de uma concentração específica de um determinado agente antimicrobiano, ainda pode ser muito valiosa na vigilância de RAM, e continua a ser amplamente utilizada em estudos de epidemiologia molecular envolvendo linhagens resistentes de vários patógenos de origem alimentar, como *Escherichia coli* (LI *et al.*, 2020), *Salmonella spp.* (MONTE *et al.*, 2019) e *Staphylococcus aureus* (SILVA, RODRIGUES e SILVA, 2020).

O sequenciamento completo de genoma (*whole genome sequencing* – WGS) tem sido utilizado para refinar a descrição do perfil de resistência de linhagens bacterianas, permitindo não só a detecção de genes de resistência presentes em seu genoma, mas também fornecendo um panorama acerca da sua localização em elementos genéticos móveis (COLLINEAU *et al.*, 2019). Além disso, o WGS pode determinar outras características de importância para a saúde pública, como aspectos relacionados a evolução, origens, rotas de transmissão e virulência. Essa metodologia pode ser uma adição valiosa a um sistema de vigilância nacional e um complemento à vigilância fenotípica (HUNT *et al.*, 2017; MCARTHUR e TSANG, 2017; BAKER *et al.*, 2018; OMS, 2020).

Devido ao declínio contínuo nos custos associados e a crescente disponibilidade de ferramentas de bioinformática, WGS microbiano tem se tornado uma tecnologia mais acessível. De fato, um número cada vez maior de genomas

bacterianos tem sido publicado, oferecendo uma grande fonte de informação em relação à dinâmica dos genes de resistência no contexto clínico, ambiental e alimentar (ROSSEN, FRIEDRICH e MORAN-GILAD, 2018; COLLINEAU *et al.*, 2019). No entanto, a aplicação do WGS para levantamento de RAM especificamente em alimentos e amostras relacionadas a alimentos ainda não é tão extensa, representando 12,6% de todos as publicações revisadas por pares relacionadas a WGS que tratam da RAM. Além disso, a maioria de suas aplicações para vigilância de RAM em alimentos disponíveis na literatura são focadas em patógenos de alta prioridade transmitidos por alimentos, como *Salmonella*, *Campylobacter spp*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* ou *S. aureus* (ONICIUC *et al.*, 2018). Espera-se que ao longo do tempo, o WGS melhore a vigilância da RAM, fornecendo uma maior compreensão da veiculação de bactérias resistentes e genes de resistência em toda a cadeia de produção alimentar (HENDRIKSEN, *et al.*, 2019; HURTADO *et al.*, 2022).

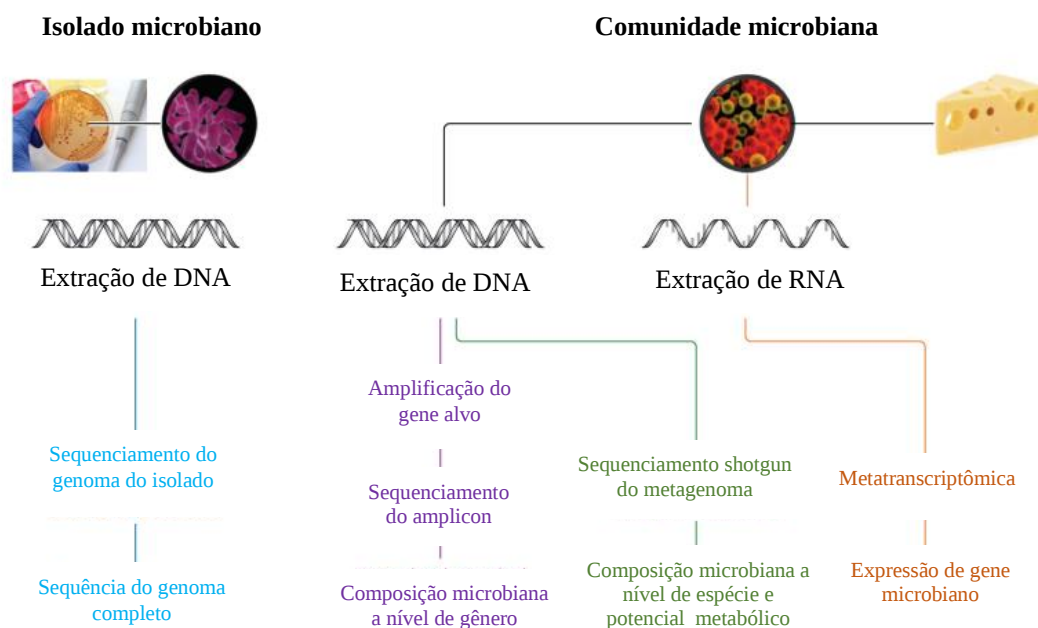


Figura 3. Visão geral das diferentes abordagens de sequenciamento aplicáveis à microbiologia de alimentos. Fonte: adaptado de Walsh et al, 2017.

3. OBJETIVOS

3.1 Parte 1

3.1.1 Objetivo geral

Caracterizar a microbiota de amostras de queijo Minas Frescal (QMF) com selo de inspeção federal (SIF) por sequenciamento metagenômico.

3.1.2 Objetivos específicos

- Obter DNA metagenômico e preparar bibliotecas de *amplicons* do gene 16S rRNA para sequenciamento a partir de amostras de QMF.
- Estabelecer por análise de bioinformática, a identidade das populações bacterianas dominantes no metagenoma das amostras de QMF e realizar inferências sobre alfa (α) e beta (β) diversidade;
- Avaliar a distribuição microbiana entre as amostras de QMF para estabelecer relação de ocorrência microbiana, segurança e qualidade microbiológica;

3.2 Parte 2

3.2.1 Objetivo geral

Isolar bastonetes Gram negativos de amostras de QMF com selo de inspeção federal (SIF) para determinação do seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, potencial de mobilidade gênica e sequenciamento completo de genoma.

3.2.2 Objetivos específicos

- Isolar por cultura seletiva quantitativa e caracterizar presuntivamente bastonetes Gram negativos (enterobactérias e bastonetes não fermentadores

de glicose) a partir de amostras de QMF adquiridas no varejo em Juiz de Fora-MG;

- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos entre os Gram negativos isolados e caracterizados presuntivamente;
- Avaliar a ocorrência de integrons de classe 1 nos isolados Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos através de PCR convencional;
- Selecionar isolados bacterianos representativas com resistência aos antimicrobianos e potencial de mobilidade gênica para preparação de bibliotecas para sequenciamento completo de genoma;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

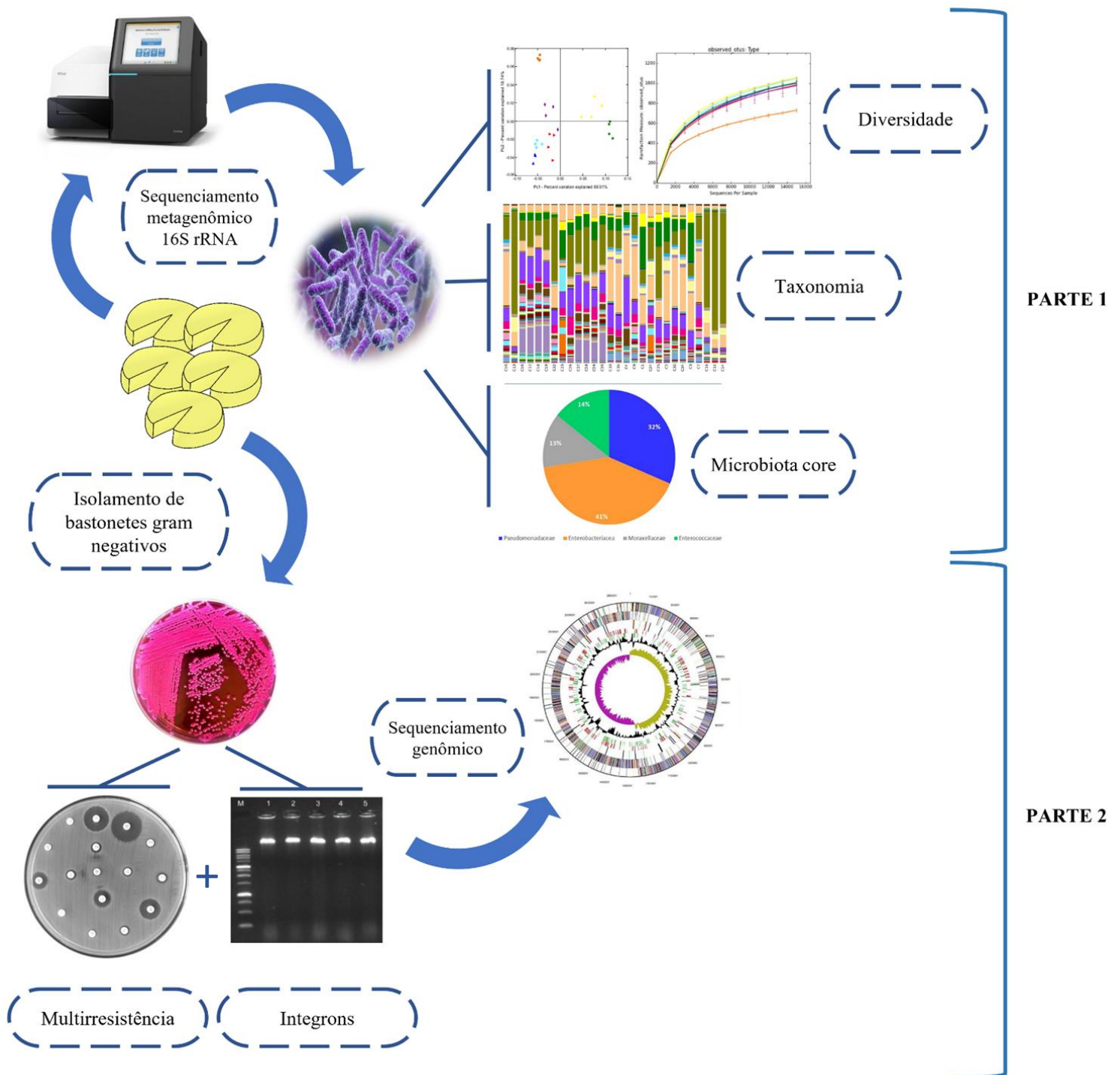


Figura 4. Delineamento experimental. Fonte: elaborado pela autora.

4.2 Parte 1

4.2.1 Processamento das amostras e extração de DNA total

Um total de 28 amostras de QMF de sete diferentes marcas comerciais (A, B, C, D, E, F e G) foram adquiridas no varejo de Juiz de Fora (MG) no período de abril a julho de 2016. Todos os queijos foram fabricados na região da Zona da Mata de Minas Gerais com Selo de Inspeção Federal. Seguindo este regulamento, os queijos foram elaborados a partir de leite bovino pasteurizado. Após a aquisição, as amostras foram mantidas sob refrigeração e enviadas ao laboratório para processamento imediato, conforme descrito por Paula et al. (2018). Porções de 25 g de cada amostra foram pesadas e homogeneizadas em tampão citrato de sódio estéril (225 mL de uma solução a 2% (p/v), pH 7,5). Posteriormente, alíquotas de 50 mL foram centrifugadas (14.000 x g, 10 min), e o sobrenadante contendo a camada de gordura foi descartado. O *pellet* obtido foi colocado em solução com 10 mL de Tris-EDTA (TE) (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, pH 8) e depois centrifugado a 14.000 x g por 10 min. Essa etapa foi repetida duas vezes e o *pellet* obtido foi ressuspense em 200 µL de tampão TE. O DNA foi extraído do *pellet* de células usando o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi medida por fluorimetria usando um fluorômetro Qubit 2.0, com o kit Qubit dsDNA HS Assay (Life Technologies, EUA). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O DNA purificado resultante foi armazenado a -70 °C até o uso.

4.2.2 Preparação da biblioteca e sequenciamento de *amplicons* do 16S rRNA

Quatro amostras de cada marca de QMF - as quais em estudo anterior do nosso grupo apresentaram alta similaridade da comunidade microbiana por análise de *fingerprint* (PAULA et al., 2018) - foram selecionadas para sequenciamento metagenômico. As regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas usando o par de primers 341F e 806R (Klindworth et al., 2013). Os *primers* foram modificados para conter uma sequência *overhang* (em destaque sublinhada) complementar ao Índice Nextera XT (Illumina, EUA), da seguinte forma:

341F (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

CCTACGGGNGGCWGCAG -3') e 806R (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC C-3'). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL contendo 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 2,5 µM de cada *primer* e 12,5 ng de DNA. As condições do ciclo foram 95°C (3 min), seguido por 25 ciclos de 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (30 s) e uma extensão final de 72°C (5 min).

As bibliotecas foram purificadas usando esferas AMPure XP (Beckman Coulter, EUA) de acordo com o protocolo da biblioteca de sequenciamento metagenômico Illumina 16S. Os *amplicons* foram ligados a uma sequência de índice durante uma segunda PCR, contendo 25 µL de 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 5 µL de cada index Nextera XT, 5 µL do produto purificado por PCR e 10 µL de água ultrapura (volume final de 50 µL). As condições do ciclo foram 95 °C (3 min), seguido de 8 ciclos de 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s), com uma extensão final de 72 °C (5 min). As bibliotecas foram novamente purificadas usando esferas magnéticas e o tamanho foi verificado pelo Bioanalyzer DNA 1000 Assay (Agilent, EUA). A quantificação foi realizada com o KAPA Library Quantification Kit Illumina (Roche, Suíça) e posteriormente, as bibliotecas de DNA foram normalizadas e agrupadas. As bibliotecas foram sequenciadas em pares (2 × 300) em uma única corrida na plataforma Miseq (Illumina, EUA). O sequenciamento foi realizado na plataforma Next Generation Sequencing do Instituto René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-MG).

4.2.3 Análise de dados

Os dados do sequenciamento foram analisados de acordo com o pipeline recomendado pelo *Brazilian Microbiome Project*, disponível em <http://brmicrobiome.org> (PYLRO et al., 2014). O controle de qualidade da sequência foi realizado com Trimmomatic v0.32 (BOLGER, LOHSE, e USADEL, 2014), e as sequências foram truncadas para o tamanho de 100 bp. As sequências únicas (singletons) foram removidas. O agrupamento de sequências foi realizado seguindo o método UPARSE em 97% de similaridade de corte (EDGAR, 2013). A taxonomia foi atribuída com SILVA 132 (QUAST et al., 2013) utilizando o QIIME v. 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010).

A estimativa da diversidade foi realizada pelo pacote QIIME (BOLGER *et al.*, 2014). Curvas de rarefação foram construídas com base na riqueza de unidades taxonômicas operacionais (OTU) em função da profundidade de sequenciamento, para avaliar o esforço do sequenciamento. Para a diversidade alfa, foram considerados os índices de riqueza Chao1, Shannon e Simpson. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os valores dos índices usando o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA), seguido de um teste de Tukey a 1% de probabilidade. Para estimativas de β diversidade, a análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada usando as métricas de distância ponderada UniFrac.

Os dados de sequência foram submetidos às bases de dados do GenBank e estão sob os números de acesso SAMN10721671, SAMN10721672, SAMN10721673, SAMN10721674, SAMN10721675, SAMN10721676, SAMN10721677, SAMN10721678, SAMN10721679, SAMN10721680, SAMN10721681, SAMN10721682, SAMN10721683, SAMN10721684, SAMN10721685, SAMN10721686, SAMN10721687, SAMN10721689, SAMN10721689, SAMN10721690, SAMN10721691, SAMN10721692, SAMN10721693, SAMN10721694, SAMN10721695, SAMN10721696, SAMN10721697, SAMN10721698.

4.3 Parte 2

4.3.1 Isolamento de bastonetes Gram-negativos

Amostras de QMF correspondentes as mesmas marcas comerciais selecionadas para o sequenciamento da microbiota (Parte 1) foram adquiridas no varejo de Juiz de Fora (MG) no período de abril a agosto de 2018, totalizando 14 amostras. Partes de toda extensão dos queijos foram colocadas em frasco estéril e pesadas. Uma amostra de 25g de queijo foi adicionada à 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) (BD-Difco/Brasil), constituindo a diluição 10^{-1} . Essa diluição foi homogeneizada por 5 minutos à 180 rpm em Agitador G26 (Didática SP/Brasil), e posteriormente, foram realizadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Para a recuperação de bastonetes Gram negativos (BGN), uma alíquota de 0,1 mL de cada uma das diluições foi inoculada por esgotamento (*spread-plate*) em placa de Petri contendo Ágar MacConkey (MAC - Kasvi, Brasil), em duplicata, com a utilização de alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram incubadas à 37°C, por 24 horas e as contagens de unidades formadoras de colônias foram realizadas em placas apresentando entre 30 e 300 colônias. Após a contagem, 3 a 5 colônias de cada morfotipo presente nas placas foram selecionadas e cultivadas em Ágar Brain-Heart Infusion (BHI – Kasvi, Brasil). A partir do subcultivo em ágar BHI, as características morfotintoriais das colônias foram avaliadas pela coloração de Gram. Procedeu-se também a inoculação em ágar Triple Sugar Iron (TSI – Kasvi, Brasil) para identificação presuntiva (Item 4.3.2) e, posteriormente, os isolados foram armazenados por congelamento a -20°C em caldo BHI adicionado de glicerol a 20% (Figura 5).

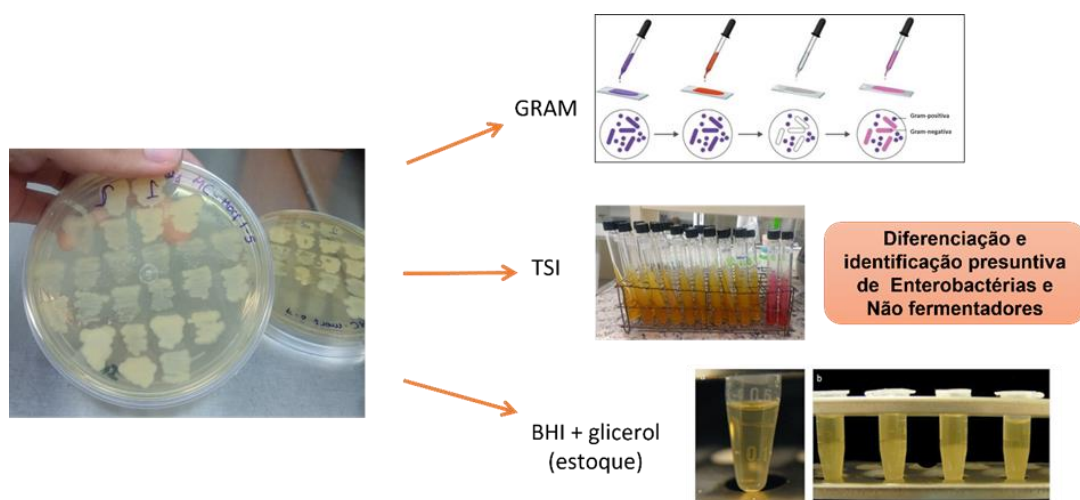


Figura 5. Subcultivo dos isolados em Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) e experimentos posteriores. Fonte: próprio autor

4.3.2 Identificação presuntiva de bastonetes Gram-negativos

Os bastonetes Gram negativos isolados foram presuntivamente identificados quanto à sua capacidade de fermentação de glicose, sacarose e lactose, bem como a capacidade de produção de gás em meio de cultura ágar Triple Sugar Iron (TSI – Kasvi, Brasil). Para isso, os isolados foram inoculados em ágar TSI e incubadas a 36°C por 24 horas. Levando em consideração os resultados observados, os isolados identificados como enterobactérias e não fermentadores de carboidratos foram separados em grupos de identificação presuntiva.

4.3.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados congelados em caldo BHI adicionado de glicerol (20%) foram reativados para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, o qual foi realizado de acordo com o método de disco difusão descrito por Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), em ágar Mueller Hinton (Kasvi - Brasil) e com a utilização de discos impregnados com os antimicrobianos de interesse clínico humano comercialmente disponíveis (DME/Brasil). Dentre os antimicrobianos recomendados para as enterobactérias, foram testados: ampicilina (AMP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg),

ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), ertapenem (ERT 10 µg) sulfametoxazol/trimetoprim (SUT, 25 µg) e tetraciclina (TET, 30 µg). Para os isolados do grupo de bastonetes não fermentadores (BGNNF) foram testados: imipenem (IPM, 10 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), ampicilina/sulbactam (APS, 20 µg), cefepime (CPM, 30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (SUT, 25 µg), amicacina (AMI, 30 µg), levofloxacina (LEV, 5 µg), meropenem (MPM, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), gentamicina (GEN, 10 µg) e piperacilina/tazobactam (PIT, 110 µg).

Após incubação por 24 horas a 37°C, os halos formados foram medidos e os valores comparados com a tabela padrão descrita pela 31ª edição do protocolo M100 do CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) do ano de 2021, categorizando as amostras como sensível, sensibilidade intermediária ou resistente. A classificação proposta por Magiorakos e colaboradores (2011), que define o fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos como a não suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes antimicrobianas distintas, foi utilizada para determinar quais isolados poderiam ser considerados multirresistentes aos antimicrobianos testados.

Um isolado com fenótipo de resistência a cefalosporina de terceira geração foi selecionado para a identificação por uma empresa terceirizada através do sistema Vitek 2 (BioMérieux, França), que realiza a identificação bacteriana automatizada por meio de testes bioquímicos com identificação colorimétrica a partir de suspensão bacteriana ajustada para a escala de McFarland 0,5.

4.3.4 Extração de DNA e detecção de integron de classe 1

O DNA total dos isolados que apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos testados foi extraído usando o kit comercial Promega Wizard® DNA Extraction, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA genômico foi determinada por espectrofotometria usando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite, de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl-Borato-EDTA), o qual foi corado com brometo de etídio e analisado em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). O DNA extraído foi aliquoteado e armazenado em freezer a -70°C.

O gene para integrase *int1* (amplicon de 470 pb) foi pesquisado a partir do DNA extraído. As reações de PCR para detecção de integron foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 1 X Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,4 µM de *primer forward* (HS464 - ACATGCGTGTAATCATCGTCG), 0,4 µM de *primer reverse* (HS463a - CTGGATTTCGATCACGGCACG) e 1 µL de DNA (~20 ng/µL). As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Biometra T1 Thermal Cycler, Gttingen, Alemanha) sob as seguintes condições: 3 min a 94°C; 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min e 30 seg a 72°C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Após eletroforese em gel de agarose 1,5%, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (Promega, USA). O branco foi realizado a partir de reações sem DNA molde e para o controle positivo, utilizou-se amostra de DNA metagenômico previamente positiva para o gene *int1* (de PAULA et al., 2018).

A técnica de *fingerprinting*, através da amplificação de sequências palindrômicas repetitivas extragênicas por reação em cadeia da polimerase (rep-PCR) foi utilizada para comparar o perfil genômico dos isolados portadores de integrons de classe 1, e verificar se pertenciam a mesma linhagem. A análise rep-PCR foi realizada utilizando o DNA extraído dos isolados positivos para o gene *int1*. As reações foram realizadas de acordo com Gaber e colaboradores (2015), utilizando um único primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGTGGTGGTG-3'). A reação da PCR continha 1 X Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA), 0, 8 µM do primer, 1 µL de DNA (~20 ng/µL) e água ultrapura para PCR (Promega, EUA) foi adicionada para um volume final de 25 µL. As condições da PCR foram: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 50°C; 2,5 min a 72°C; e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) por 2 h a uma voltagem constante de 100 V em tampão Tris/Acetato/EDTA 1x (TAE). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA). Os géis foram corados com brometo de etídio e as imagens foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido).

4.3.5 Sequenciamento completo do genoma

Para a caracterização por sequenciamento completo do genoma, três isolados presuntivamente identificados como BGNNF foram selecionados, baseados na relevância do fenótipo de resistência apresentado ou na presença de integrons de classe1: um isolado (Q1) previamente identificado pelo sistema Vitek2 com fenótipo de resistência a ceftazidima (item 4.3.3); e dois isolados (Q2 e Q3) positivos para o gene *int1* previamente detectado por PCR (item 4.3.4). As amostras de DNA genômico dos três isolados previamente extraídas (conforme descrito no item 4.3.4) foram ajustadas seguindo recomendações da empresa responsável pelo sequenciamento (concentração mensurada no Qubit 2.0, com o kit Qubit dsDNA HS Assay, superior à 20ng/ul e volume de aproximadamente 20 µL) (GenONE, Brasil). As etapas de preparo de biblioteca, controle de qualidade da biblioteca e sequenciamento foram realizadas por empresa terceirizada (GenONE, Brasil). As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas na plataforma HiSeq 2500 (Illumina, EUA), com leituras *paired end* (2 × 150 pb).

4.3.6 Análises preliminares dos dados genômicos

Os dados brutos obtidos do sequenciamento foram previamente avaliados com o programa FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) de acordo com o valor médio de *Phred* na posição de cada base do conjunto de dados. O controle de qualidade visando a remoção das sequências de baixa qualidade foi realizado utilizando a ferramenta Trimmomatic v0.39 (<https://github.com/usadellab/Trimmomatic>).

O genoma foi montado utilizando o software SPAdes (<https://github.com/ablab/spades>) com os seguintes parâmetros: o tamanho dos *k-mers* foi 21, 33, 55, 77, 99, 127 e foram reservados quatro processadores para a análise. O software seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) foi usado para excluir os *contigs* com tamanho menor que 500 pb. O programa QUAST (<https://github.com/ablab/quast>) foi utilizado para a verificação da qualidade da montagem dos genomas através das métricas de N50, número de *contigs*, maior *contig*, % GC e outros. O software também foi utilizado para prever as regiões codificadoras do gene 16S rRNA.

A identificação dos genomas seguiu a seguinte estratégia: 1) alinhamento, através do BLAST (*Basic Alignment Tool*), das sequências codificadoras dos genes 16S rRNA, extraídas de cada genoma, contra o banco de dados do GenBank. Para o refinamento da identificação taxonômica dos resultados inconclusivos dentro de uma ou mais espécies e/ou gêneros, foi feita uma busca pelos seus genomas de referências no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> utilizando o *database* de genomas. Em seguida, os respectivos genomas de referência foram baixados em formato FASTA; 2) Em posse dos arquivos contendo os *contigs* e dos genomas de referência para cada identificação ou suspeita de identificação, foi realizada uma análise de identidade média de nucleotídeo (*Average Nucleotide Identity*) baseada em BLAST (ANi) através do programa JSspeciesWS (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>) (RICHTER *et al.*, 2016).

Os arquivos contendo os *contigs* maiores que 500 pb foram utilizados para a anotação automática através do PATRIC (<https://www.bv-brc.org/>). A busca de *replicons* de plasmídeos e genes de resistência à antimicrobianos foi realizada, com uma identidade e cobertura mínima de 95%, por meio do software ABRicate, que utiliza os bancos de dados ARG-ANNOT, PlasmidFinder, NCBI “Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene”, MEGARES e CARD.

5 RESULTADOS

5.1 Parte 1

5.1.1 Sequenciamento e estimativas de diversidade

Um total de 2.025.720 sequências de boa qualidade do gene 16S rRNA foram obtidas de 27 amostras de QMF, correspondendo a 181.220, 185.578, 188.554, 555.235, 368.456, 432.871 e 113.806 reads das marcas A, B, C, D, E, F e G respectivamente (Tabela 2). Como a qualidade das sequências de uma amostra de QMF da marca B não atendeu aos critérios de qualidade esperado, esta foi excluída do estudo. O gráfico de rarefação indicou que o esforço geral do sequenciamento foi suficiente para alcançar a diversidade bacteriana dentro das amostras de QMF independentemente das marcas, uma vez que as curvas obtidas tenderam a atingir uma assíntota (Figura 6).

A diversidade de espécies (α -diversidade) revelou alta riqueza (Chao1) e uma microbiota diversificada (índice de Shannon e Simpson) (Tabela 2). Ao comparar as diferentes marcas de QMF, a marca C apresentou uma riqueza e diversidade de espécies significativamente menor em relação às outras (Tabela 2). A análise de β -diversidade resultante do UniFrac PCoA ponderado sugere diferentes padrões microbianos entre as amostras de queijo, mas um padrão semelhante dentro de uma marca, levando a diferentes aglomerados microbianos de acordo com as diferentes marcas de QMF (Figura 7). Os padrões de microbiota de todas as réplicas das marcas A, B, C, F e G foram agrupados dentro de um mesmo quadrante, se comparados com as marcas D e E (Figura 7).

Tabela 2. Números de leitura obtidos de sequenciamento, número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), estimadores de riqueza e índices de diversidade das marcas, normalizados para 15.000 leituras.

Marca	Nº reads	Nº OTUs	Índice de riqueza	Índice de diversidade	
			Chao1	Shannon	Simpson
A	181220	982,400 ± 47,504	1262.564 ± 46.379 a	7,547 a	0,983 a
B	185578	1000,533 ± 18,372	1270.903 ± 11.007 a	7,537 a	0,982 a
C	188554	729.650 ± 16.468	989.441 ± 18.514 b	6,734 b	0,963 a
D	555235	1005.375 ± 12.422	1262.553 ± 12.206 a	7,755 a	0,987 a
E	368456	975.775 ± 80.532	1244.113 ± 74.163 a	7,601 a	0,982 a
F	432871	1052.775 ± 19.415	1284.424 ± 34.412 a	7,956 a	0,988 a
G	113806	1050.025 ± 13.587	1303.633 ± 28.896 a	7,913 a	0,990 a

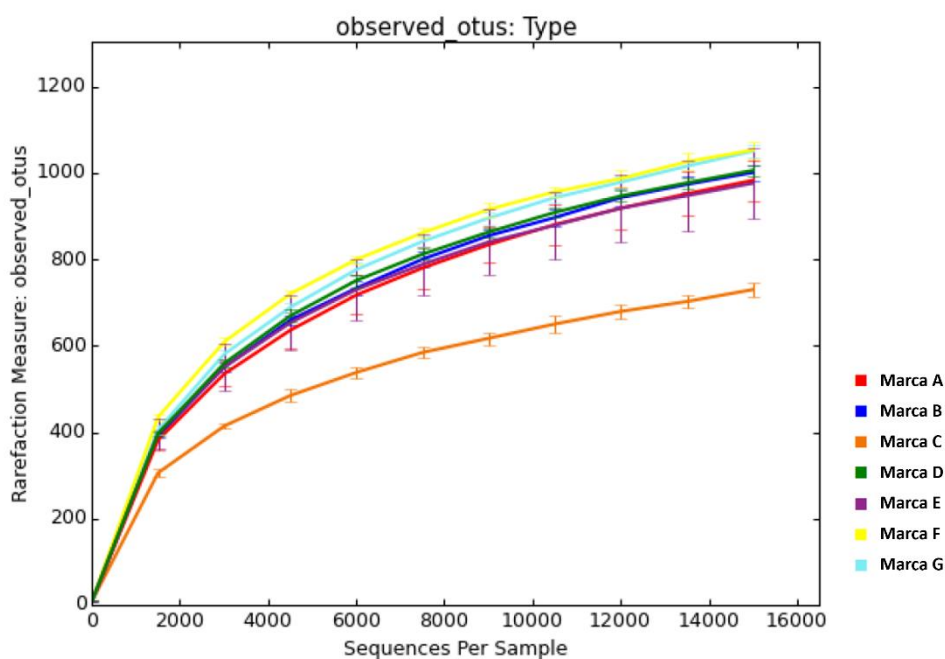


Figura 6. Curvas de rarefação de diferentes marcas de Queijo Minas Frescal (QMF). A rarefação foi estimada usando o software QIIME com base no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observado (normalizado para 15.000) de cada marca.

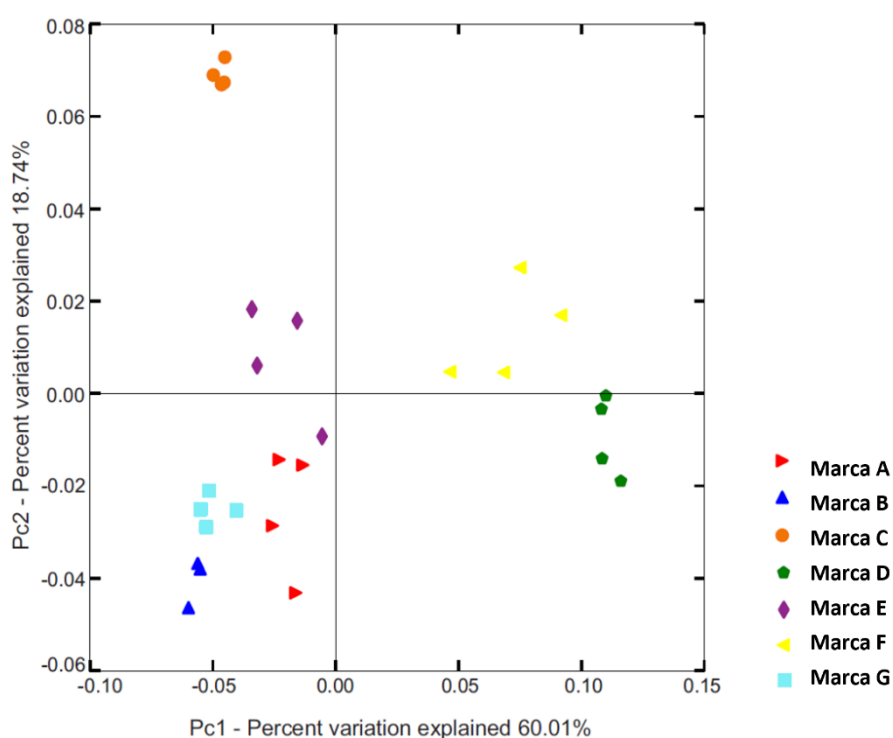


Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras de queijo Minas Frescal (QMF), geradas com matriz de distância ponderada Unifrac. As cores referem-se à Marca A (vermelho), Marca B (azul escuro), Marca C (laranja), Marca D (verde), Marca E (roxo), Marca F (amarelo), Marca G (azul claro).

5.1.2 Perfil taxonômico das amostras de Queijo Minas Frescal (QMF)

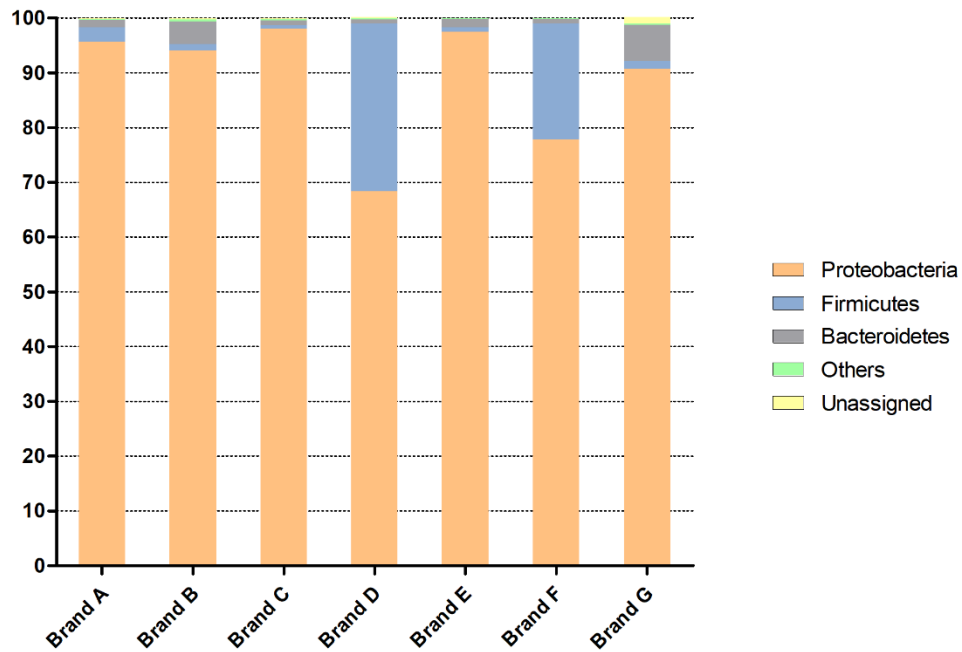
A distribuição taxonômica de bactérias é mostrada na figura 8a em nível de filo. Pequenas diferenças na abundância de táxons bacterianos foram observadas entre as marcas de MFC. A atribuição filogenética dos dados de sequenciamento mostrou a ocorrência de treze diferentes filos de bactérias. Proteobacteria foi o mais representativo em todas as amostras de queijo, correspondendo a uma média de 88,7% de todas as sequências lidas. Firmicutes foi o segundo filo de bactérias mais abundante, compreendendo 8,4% de todas as sequências lidas, mas com maior contagem em amostras de queijo pertencentes às marcas D e F (29–31% e 17–27%, respectivamente). Bacteroidetes (2,5%) e filos menos dominantes também foram detectados, mas em menor frequência (representados na figura 8a como outros filos). As OTUs não atribuídas indicadas na figura 8a representam as OTUs que não foram classificadas no nível de Filo.

Considerando o nível de gênero, as diferenças entre os queijos tornam-se mais evidentes. A figura 8b mostra os gêneros bacterianos que contribuíram com 1% ou mais ($\geq 1\%$) para a distribuição geral nas marcas. Cerca de 10 a 31% das sequências de cada marca analisada correspondiam a OTUs não atribuídos, que não foram classificados no nível de gênero, mas estavam presentes nos níveis superiores. Os resultados mostraram que bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Vibrio* constituíram os principais grupos apresentados na maioria das amostras e por marcas.

Em nível de gênero, os membros do filo Firmicutes correspondiam, quase que exclusivamente, a *Enterococcus*. Os resultados indicam que as frequências de detecção de *Enterococcus* foram maiores nas amostras das marcas D e F do que nas demais marcas. Em geral, foi observada baixa abundância para o grupo de bactérias lácticas em todas as marcas. Dentro deste grupo (abundância $\geq 1\%$) *Enterococcus* foi observado nas marcas A (1%), D (16%) e F (14%), enquanto *Lactococcus* foi observado nas marcas D (2%) e F (1%) e *Streptococcus* foi observado na marca D (1%).

Considerando as populações subdominantes, os dados recuperados mostraram uma série de outros grupos notáveis. *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Marinomonas*, *Escherichia-Shigella*, *Moraxella*, *Chryseobacterium* e *Pseudoalteromonas* foram encontrados entre as marcas de QMF avaliadas. Foi perceptível, no entanto, que as amostras pertencentes à Marca C abrigavam um perfil bacteriano significativamente diferente. Esta marca apresentou menor diversidade (Tabela 2), dominada claramente por *Pseudomonas* (74% das sequências), embora outros gêneros estivessem presentes, incluindo *Escherichia-Shigella*, *Moraxella*, *Azobacter* e *Stenotrophomonas*.

a)



b)

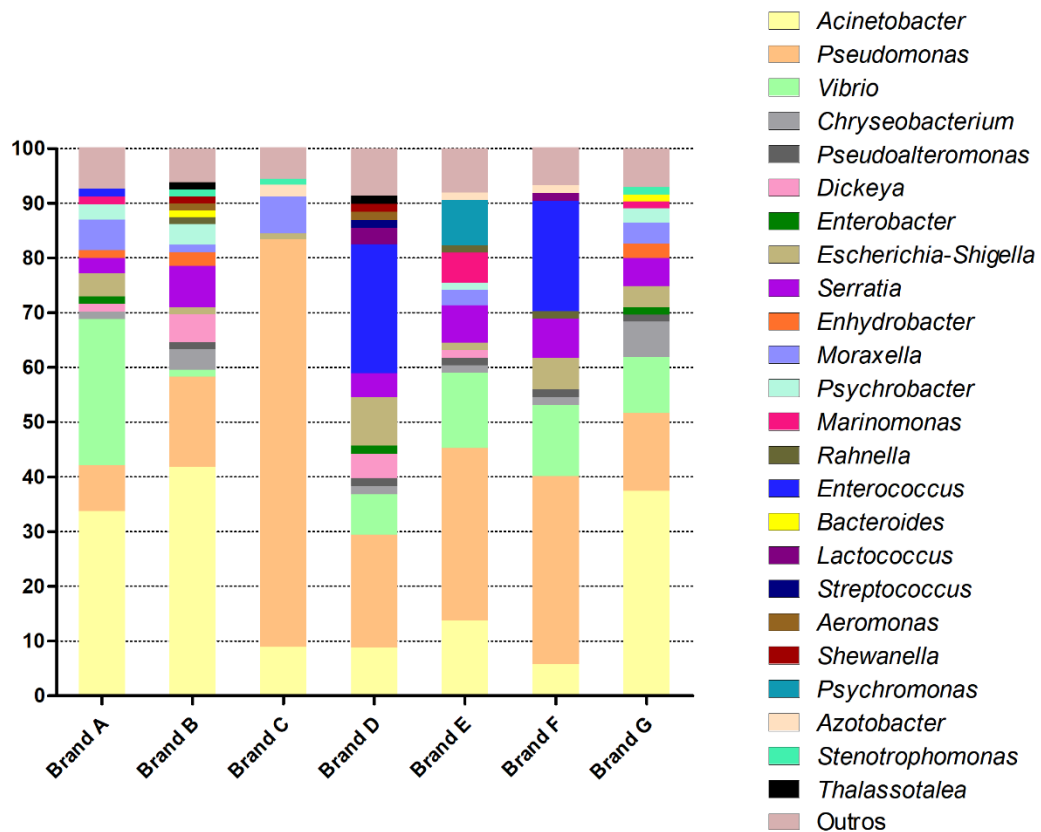


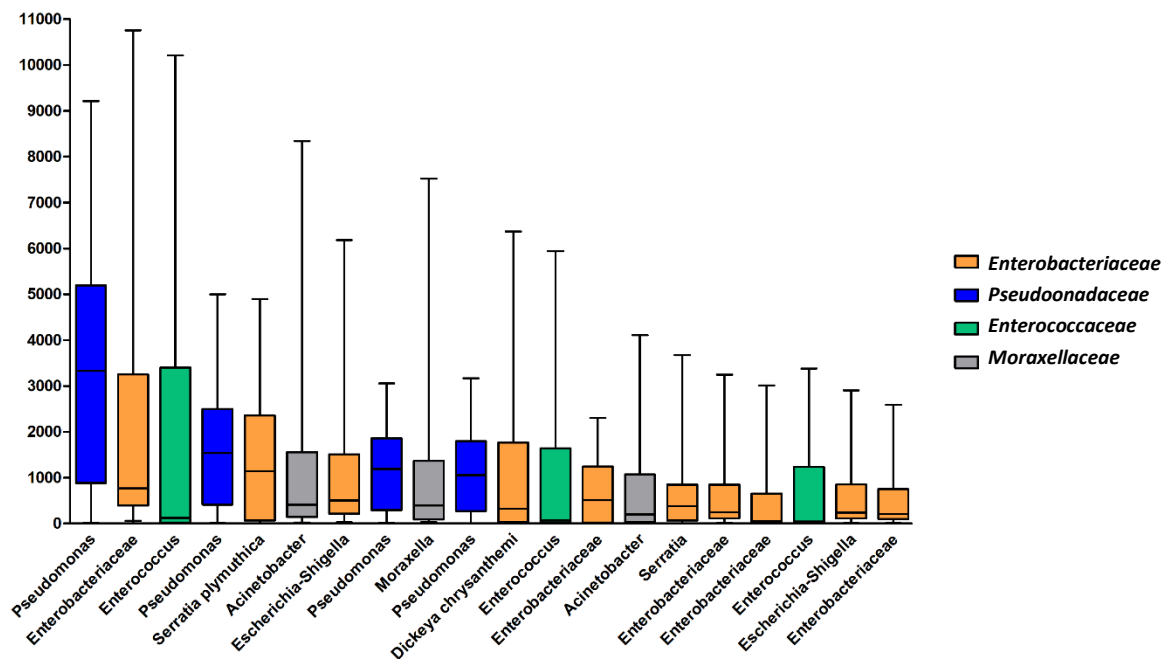
Figura 8. Abundâncias relativas de bactérias no (a) nível de filós (b) e nível de gêneros. Os resultados são mostrados como uma média de leituras geradas a partir de amostras individuais de queijo de cada marca. Apenas filós e gêneros com abundância relativa maior ou igual a 1% ($\geq 1\%$) foram incluídos. Todas as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com menor abundância foram agrupadas como “outras”.

5.1.3 Microbiota central comum “core”

Para evidenciar a microbiota central comum do QMF, uma análise mais refinada foi realizada. Um total de cento e noventa OTUs estavam presentes em todas as amostras de QMF e foram consideradas como membros centrais da microbiota. A figura 9a resume as 20 mais abundantes e inclui OTUs em nível de família (*Enterobacteriaceae*), nível de gênero (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus* e *Moraxella*) e nível de espécie (*Serratia plymuthica* e *Dickeya chrysanthemi*).

Notavelmente, os membros da família *Enterobacteriaceae* dominaram entre as OTUs mais abundantes da microbiota central comum, correspondendo a 41% das leituras, seguidas pela família *Pseudomonadaceae*, com 32% (Fig. 9b). Os gêneros da família *Moraxellaceae* (*Acinetobacter* e *Moraxella*) e da família *Enterococcaceae* (*Enterococcus*) corresponderam a 14% e 13% das OTUs mais abundantes encontradas na microbiota central comum, respectivamente.

a)



b)

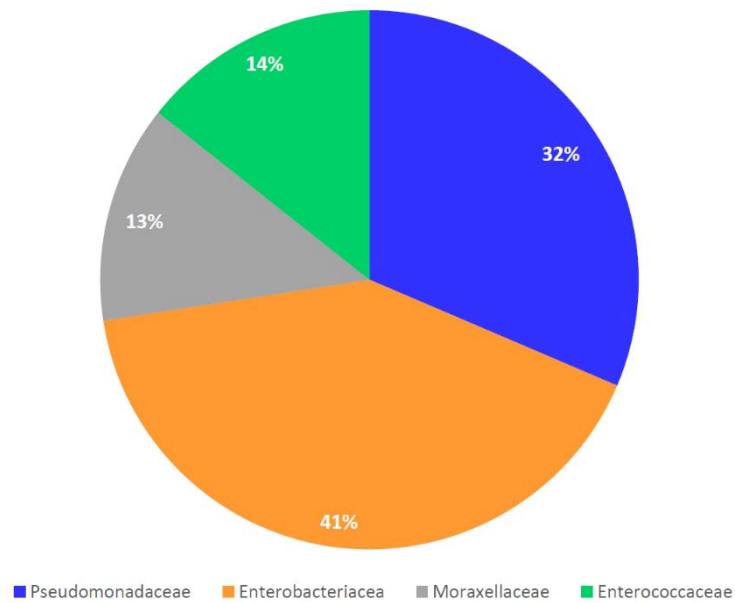


Figura 9. Microbiota core. (a) Box plots exibindo a mediana, mínimo, máximo, primeiro e terceiro quartis do número de leituras atribuídas às 20 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) mais abundantes da microbiota central comum detectada em todas as amostras de queijo. (b) Abundâncias relativas das famílias correspondentes às 20 OTUs mais abundantes do microbioma central comum. As cores referem-se a representantes da família *Enterobacteriaceae* (laranja), família *Pseudomonadaceae* (azul), família *Enterococcaceae* (verde) e família *Moraxellaceae* (cinza).

5.2 Parte 2

5.2.1 Caracterização dos morfotipos bacterianos

Após isolamento em meio Ágar MacConkey, as colônias foram caracterizadas morfológicamente e 14 diferentes morfotipos foram observados (Tabela 3). Foram selecionados de três a cinco isolados de cada morfotipo, resultando em um estoque de 226 isolados bacterianos.

Tabela 3: Caracterização e quantidade dos morfotipos obtidos em ágar MacConkey

Identificação	Morfologia	Total
M1	Média, irregular, transparente, opaca, seca	4
M2	Média, circular, translúcida, rosa, úmida, ponto rosa forte no centro	41
M3	Média, irregular, opaca, rosa, membranosa, seca	38
M4	Média, irregular, opaca, rosa (forte), seca	35
M5	Média, circular, translúcida, rosa, úmida	36
M6	Média, irregular, translúcida, rosa, úmida, halo amarelado	7
M7	Grande, irregular, opaca, rosa, seca	5
M8	Pequena, irregular, opaca, rosa, seca	9
M9	Média, circular, translúcida, rosa, úmida, halo rosa forte	6
M10	Média, circular, opaca, rosa, seca, halo amarelado	5
M11	Pequena, circular, opaca, branca/transparente, seca, halo amarelado	21
M12	Pequena, puntiforme, rosa (pink), úmida	6
M13	Pequena, circular, translúcida, rosa, úmida	5
M14	Pequena, circular, opaca, rosa, seca	8
TOTAL		226

5.2.2 Identificação presuntiva dos bastonetes Gram-negativos

Considerando os resultados obtidos a partir da inoculação dos isolados no meio Ágar TSI, foram formados 5 grupos de identificação presuntiva dos bastonetes Gram

negativos (Tabela 4), sendo 4 grupos pertencentes a ordem *Enterobacterales* (192 isolados) e o outro grupo de isolados não fermentadores (34 isolados). O grupo G1, que sugere *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, ou *Serratia*, compreende a maioria dos integrantes, com 155 isolados (69%). O segundo grupo com mais integrantes corresponde ao grupo de bactérias Gram negativas não fermentadoras (BGNNF), com 34 isolados (15%), seguido pelo grupo sugestivo de *Escherichia* ou *Serratia*, com 28 isolados (12%). Os grupos em menor prevalência foram sugestivos de *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, ou *Proteus*, com 7 isolados (3%) e *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* ou *Yersinia*, com 2 isolados (1%).

Tabela 4: Identificação presuntiva dos bastonetes Gram negativos isolados de queijo Minas Frescal (QMF).

Grupo	Leitura	Diagnóstico presuntivo	Nº / % de isolados
G1	▪ Fermentação da glicose ▪ Fermentação de lactose e/ou sacarose ▪ Produção de CO₂	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Providencia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i>	155 / 69
G2	▪ Fermentação da glicose ▪ Fermentação de lactose e/ou sacarose ▪ Ausência de CO₂	<i>Escherichia</i> , <i>Serratia</i>	28 / 12
G3	▪ Fermentação da glicose ▪ Presença de CO₂	<i>Salmonella</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i>	7 / 3
G4	▪ Fermentação da glicose ▪ Ausência de CO₂	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i>	2 / 1
G5	▪ Ausência de fermentação	Não fermentadores (Ex. <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>)	34 / 15

Fonte: Adaptado de Anvisa, 2013 e Procop et al., 2017.

5.2.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e detecção de integron de classe 1

Após a reativação dos isolados congelados em BHI com glicerol (20%), 12 isolados de enterobactérias e 17 isolados de BGNNF se mostraram inviáveis. Por isso, do total de 226 isolados obtidos, apenas os 197 isolados viáveis foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Os resultados indicaram que para as enterobactérias, a resistência foi mais frequentemente encontrada em resposta à ampicilina, sendo 37% dos isolados resistentes (Figura 10). Um total de 16% dos isolados apresentou resistência à amoxicilina+clavulanato e 10% a cefoxitina. A resistência intermediária foi identificada para ampicilina (22%) e tetraciclina (1%). Para o grupo dos BGNNF, 76% dos isolados apresentaram resistência a ampicilina+subactam, 71% ao sulfazotrim e 6% a ceftazidima (Figura 11).

De modo geral, para as enterobactérias, 42% dos isolados apresentou resistência a alguma das drogas, sendo que destes, 29% eram resistentes a apenas uma e 6% a duas (Tabela 5). Os microrganismos resistentes a três antimicrobianos testados, todos pertencentes a classe dos beta-lactâmicos, corresponderam a 7% dos isolados. Considerando a classificação proposta por Magiorakos e colaboradores (2012), que define o fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos como a não suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes antimicrobianas, não foram encontrados isolados com perfil multirresistente no presente estudo.

Para o grupo dos BGNNF, 83% dos isolados apresentou resistência a alguma das drogas, sendo 12% resistente a apenas uma e 71% a duas. Nenhum isolado foi resistente a três ou mais antimicrobianos (Tabela 5).

A relevância do fenótipo de resistência a ceftazidima, observada em um isolado BGNNF, levou a identificação desse isolado utilizando sistema Vitek 2 (bioMérieux / França). A identidade do isolado foi definida como *Acinetobacter ursingii*, o qual foi submetido ao sequenciamento completo do genoma para análise no presente estudo (identificado como isolado Q1) (item 5.2.4).

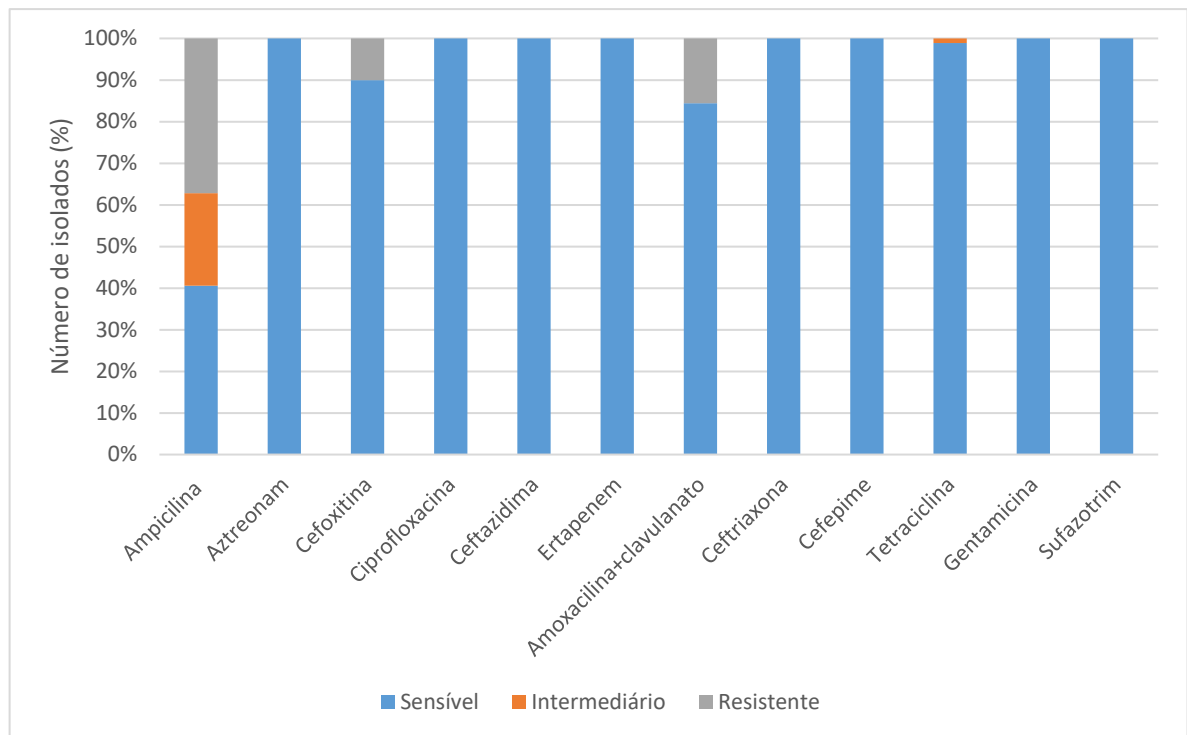


Figura 10. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas.

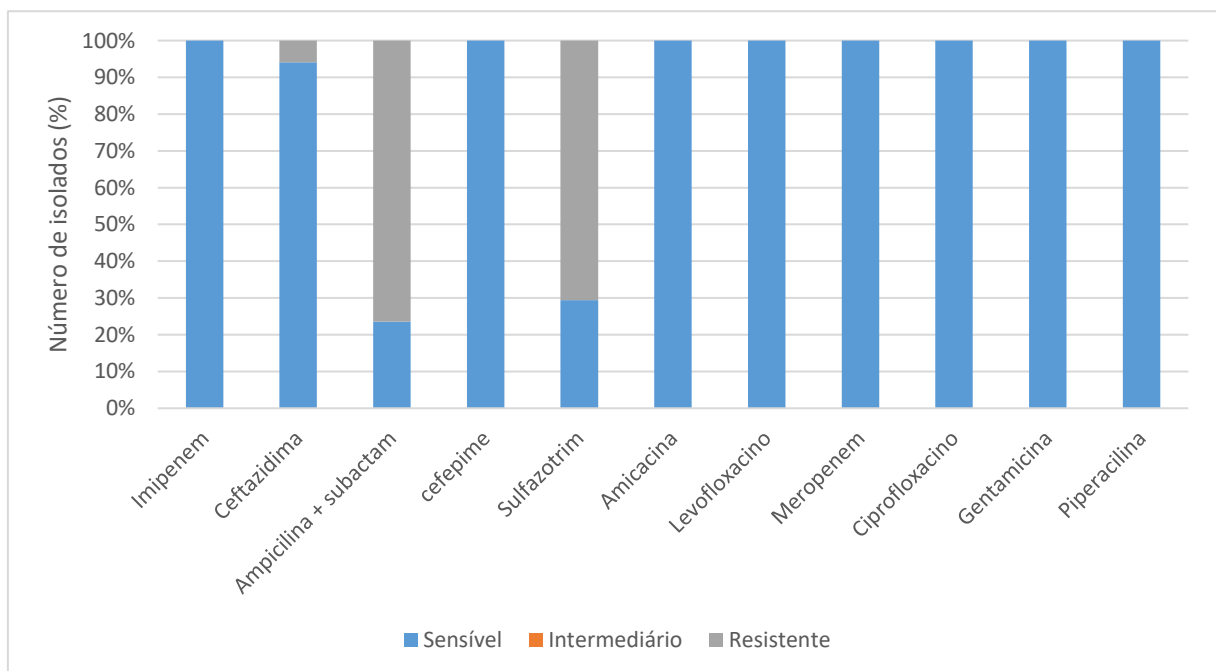


Figura 11. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) isolados.

Tabela 5. Distribuição dos fenótipos de resistência aos antimicrobianos selecionados para o estudo.

Grupo	Fenótipos de Resistência	n (%)
Enterobactérias	AMP	47 (26%)
	AMC	4 (2%)
	CFO	1 (1%)
	AMP + AMC	7 (4%)
	AMC + CFO	3 (2%)
	AMP + AMC + CFO	13 (7%)
Bacilos Gram-negativos não fermentadores	CFZ	1 (6%)
	AMP	1 (6%)
	SUL + AMP	12 (71%)

Legenda: AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFO: cefoxitina CFZ: cefatazidima; SUT: sulfazotrim;

A avaliação da presença de integrons baseada na PCR foi realizada utilizando *primer* específico para o gene *int11*, o qual foi detectado em três isolados BGNNF com fenótipo de resistência a ampicilina e sulfazotrim. Dois deles foram considerados como pertencentes a mesma linhagem (clones), pois os padrões de impressão digital (*fingerprint*) obtidos pela rep-PCR se apresentaram iguais. O sequenciamento do completo do genoma de dois isolados pertencentes a linhagens diferentes (identificados como isolados Q2 e Q3) foi realizado, visando a elucidação dos genes de resistência presentes em seu genoma. As análises referentes aos aspectos estruturais e evolutivos do integron de classe 1 serão realizadas e estudos posteriores.

5.2.4 Análises genômicas preliminares

Os dados brutos provenientes do sequenciamento dos 3 isolados selecionados (Q1, Q2 e Q3), de forma geral, exibiram ótima qualidade após o processo de trimagem. A figura 12 exemplifica a qualidade das sequências da amostra Q1. Em relação às métricas de qualidade da montagem dos genomas, foi possível observar variação no tamanho dos genomas das amostras e dos números de *contigs* das montagens, principalmente para a amostra Q1, que apresentou os menores valores para essas métricas (Tabela 6).

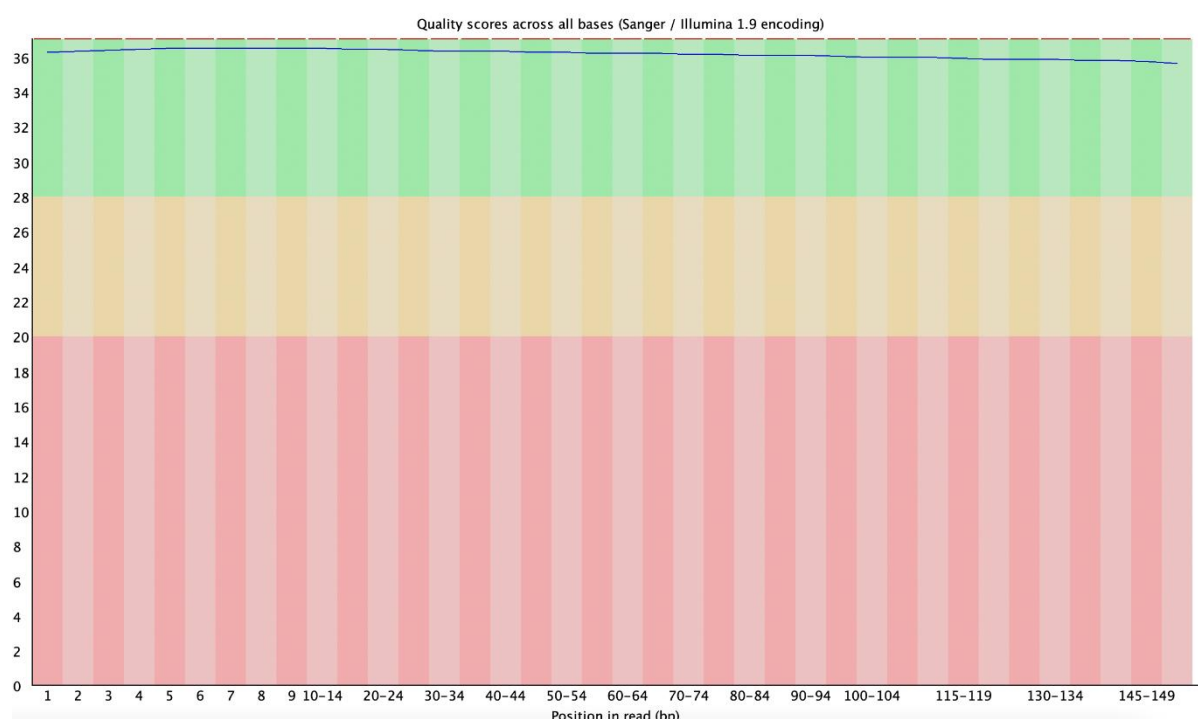


Figura 12. Qualidade da sequência por base da amostra Q1 após a trimagem. Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 6. Métricas da qualidade de montagem dos genomas dos isolados de queijos Minas Frescal (QMF).

Amostra	Tamanho total (Mb)	Número de <i>contigs</i>	Maior <i>contig</i>	N50	%GC
Q1	3,6	65	393.332	168715	39,95
Q2	5,86	173	195.922	73586	62,07
Q3	6,07	102	495.542	160960	61,06

Fonte: Elaborado pela autora

Em relação as sequências codificadoras do gene 16S rRNA, foi encontrado apenas uma cópia do gene nos três genomas. A identificação obtida através do BLAST utilizando o banco de dados do NCBI para a amostra Q1 foi *Acinetobacter ursingii*, com 100% de identidade e cobertura, confirmando a identificação realizada anteriormente pelo Vitek2. Visando o refinamento da identificação taxonômica das amostras Q2 e Q3, a qual foi inconclusiva pelo alinhamento através do BLAST, foi utilizado o parâmetro de identidade média de nucleotídeo (ANI) a partir dos genomas de referência para cada identificação ou suspeita de identificação obtidas pelo gene 16S rRNA (*Pseudomonas juntendi*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas monteilii*). Considerando que, valores de ANIb acima de 95% indicam mesma espécie, a identificação para a amostra Q2 foi definida como *Pseudomonas juntendi* (97,81% de identidade e 79,54% de alinhamento). A amostra Q3 foi identificada a nível de gênero como *Pseudomonas spp.*, considerando que o valor de ANIb foi inferior a 95% (Tabela 7).

Tabela 7. Identificação das amostras Q2 e Q3 pelo parâmetro de identidade média de nucleotídeo (ANI).

Genoma de referência	Q2	Q3
	(ANI / Alinhamento [%])	(ANI / Alinhamento [%])
<i>Pseudomonas juntendi</i>	97,81 / 79,54	86,61 / 65,53
<i>Pseudomonas putida</i>	87,15 / 68,60	89,15 / 71,49
<i>Pseudomonas monteilii</i>	87,08 / 68,87	88,67 / 71,26

Fonte: elaborado pela autora

As características genômicas referentes ao número de genes codificadores de proteínas (*coding DNA sequence* – CDS) e genes codificadores de tRNA e rRNA, obtidas pela anotação, estão resumidas da tabela 8. As análises preliminares referentes a detecção de genes de resistência aos antimicrobianos por meio do software ABRicate, permitiram a identificação de 7 diferentes genes, os quais estão relacionados a expressão de bombas de efluxo (genes *mex* e *CpxR*) e resistência a aminoglicosídeos (*ant(3'')-IIc*) (tabela 9). Não foi detectado nenhum plasmídeo nos genomas avaliados.

Tabela 8. Características genômicas obtidas pela anotação automática através do PATRIC

Amostra	CDS	tRNA	rRNA
Q1	3.471	61	11
Q2	5.700	66	6
Q3	5.864	68	7

Fonte: elaborado pela autora

Tabela 9. Genes de resistência encontrados nos genomas dos isolados de queijos Minas Frescal (QMF) por meio do *software* ABRicate

Amostra	Genes de resistência	Mecanismos de resistência
Q1 (<i>Acinetobacter ursingii</i>)	<i>ant(3'')-IIC</i>	Inativação de aminoglicosídeos
Q2 (<i>Pseudomonas juntendi</i>)	<i>mexW, mexF, mexE, mexK, mexB</i>	Presença de subunidades de bombas de efluxo
	<i>CpxR</i>	Regulação positiva da expressão de bombas de efluxo
Q3 (<i>Pseudomonas spp.</i>)	<i>mexF, mexK, mexB</i>	Presença de subunidades de bombas de efluxo
	<i>CpxR</i>	Regulação positiva da expressão de bombas de efluxo

Fonte: elaborado pela autora; adaptado de Alcock *et al.* (2023).

6 DISCUSSÃO

A microbiota dos queijos desempenha um papel fundamental na determinação das suas propriedades sensoriais, composição nutricional, qualidade e segurança. O conhecimento acerca de sua composição traz informações cruciais sobre como a microbiota impacta esses aspectos (JONNALA *et al.*, 2018). Neste estudo, o sequenciamento de alto rendimento (*high throughput sequencing* - HTS) do gene 16S rRNA forneceu um perfil detalhado sobre a microbiota do QMF, revelando tanto grupos microbianos já descritos, assim como grupos microbianos não descritos anteriormente para este tipo específico de queijo.

As amostras pertencentes a uma mesma marca e lote de QMF, apresentaram um perfil de agrupamento microbiano próximo, exceto a amostra 23 da Marca E. Esse resultado ratifica o estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, no qual as mesmas amostras também se agruparam de maneira semelhante utilizando técnica de *fingerprinting* (PAULA *et al.*, 2018). Esta observação fundamenta a reprodutibilidade das amostras, uma vez que produtos de um mesmo lote são processados sob condições semelhantes e, portanto, expostos à mesma condição microbiológica. Sob a perspectiva das diferentes marcas de queijos, os perfis taxonômicos bacterianos de cada marca agruparam-se separadamente. Lusk e colaboradores (2012), através do sequenciamento do gene 16S rRNA, também observaram comunidade microbiana contrastante entre três amostras de queijo tipo fresco pertencentes a marcas diferentes (LUSK *et al.*, 2012). Estes dados podem sugerir que, embora sejam queijos do mesmo tipo, a matéria-prima e as condições de produção de cada laticínio desempenham um papel importante na composição microbiana do produto final, contribuindo para uma estrutura bacteriana única de cada marca.

Com relação à distribuição taxonômica dos grupos bacterianos (Fig. 7), embora diversos estudo relatem a prevalência do filo Firmicutes em diferentes queijos (LUSK *et al.*, 2012; PLANÝ *et al.*, 2016; RIQUELME *et al.*, 2015; ESCOBAR-ZEPEDA, SANCHEZ-FLORES e BARUCH, 2016; SULLIVAN *et al.*, 2015), em nosso estudo, Proteobacteria foi o filo mais representativo em todas as amostras de QMF. A menor abundância de Firmicutes observada está em concordância com a baixa abundância de BAL, que neste estudo, caracterizou-se como população subdominante. Quigley e colaboradores (2012) observaram que o nível de maturação do queijo tem influência

significativa nas populações de *Lactobacillus*. O sequenciamento de alto rendimento revelou que em queijos maturados, a abundância de *Lactobacillus* são maiores em comparação com os queijos frescos (QUIGLEY et al., 2012). Em outro estudo, a baixa incidência de BAL, associado a uma maior abundância relativa de bactérias contaminantes, foi observado na ricota, um tipo de queijo fresco que não passa por maturação (STELLATO, et al., 2015).

A alta taxa de Firmicutes observada principalmente nas marcas D e F está relacionada a prevalência de *Enterococcus*. A presença de *Enterococcus* na microbiota intestinal de mamíferos suscita questões relativas à contaminação, que pode resultar em riscos sanitários para os consumidores, especialmente devido ao surgimento de espécies resistentes aos antimicrobianos (HAMMAD, HASSAN, e SHIMAMOTO, 2015). O próprio ambiente de ordenha é uma fonte potencial de *Enterococcus* no leite e, portanto, nos produtos lácteos. Esse risco aplica-se mesmo quando a pasteurização é utilizada de forma correta respeitando o binômio tempo/temperatura, uma vez que este gênero apresenta alta resistência ao tratamento térmico (ÍSPIRLI, DEMIRBAŞ e DERTLI, 2017; DAPKEVICIUS et al., 2021).

Sob a perspectivas da distribuição dos gêneros bacterianos, destaca-se a ocorrência de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Nos produtos lácteos frescos refrigerados, esses grupos bacterianos já foram relatados por estudos que utilizaram abordagens independentes e dependentes de cultivo microbiano (COTON et al., 2012; DAMACENO et al., 2015; LI et al., 2016; STELLATO et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015). Através do sequenciamento de *amplicon* do gene 16S rRNA, Stellato e colaboradores (2015) relataram que *Pseudomonas* e *Acinetobacter* foram as bactérias mais abundantes associadas à microbiota central comum em ambiente de processamento de laticínios, com abundância relativa acima de 50% (STELLATO et al., 2015). Algumas bactérias Gram negativas potencialmente patogênicas, especialmente *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, contaminam naturalmente os alimentos e seu ambiente de processamento, e essa ocorrência provavelmente se deve a capacidade de crescimento em baixas temperaturas, formação de biofilmes, baixo requerimento nutricional e versatilidade metabólica (MØRETRØ e LANGSRUD, 2017; QUINTIERI, FANELLI, e CAPUTO, 2019). Além disso, esses gêneros são reconhecidos como deterioradores de alimentos e indesejáveis em ambientes de processamento. A produção de enzimas extracelulares termoestáveis por essas bactérias pode ser prejudicial à qualidade do queijo, causando alterações no sabor e

prejudicando as propriedades de coagulação do leite. Além disso, é importante salientar que alguns membros destes grupos bacterianos são clinicamente e epidemiologicamente importantes, principalmente considerando-se o aumento da resistência aos antimicrobianos (ARSLAN, EYI, e ÖZDEMİR, 2011; STELLATO *et al.*, 2015).

O gênero *Vibrio* também foi um dos mais abundantes detectados neste estudo. Juntamente com outras populações subdominantes, como *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Marinomonas* e *Pseudoalteromonas*, estes microrganismos são considerados Proteobactérias halotolerantes e podem contaminar o QMF durante a salga. Embora esses grupos microbianos já tenham sido previamente associados a queijos frescos e maturados (COTON *et al.*, 2012; ESCOBAR-ZEPEDA *et al.*, 2016; QUIGLEY *et al.*, 2012; RIQUELME *et al.*, 2015; STELLATO *et al.*, 2015), a relevância da sua ocorrência no produto final não é muito clara, particularmente nos níveis encontrados no presente estudo. Não foram relatados efeitos negativos para a saúde resultantes do consumo de queijos em associação com estas bactérias halotolerantes, embora os grupos *Psychrobacter* e *Aeromonas* possam estar envolvidos em processos de deterioração dos alimentos.

A ocorrência de *Escherichia-Shigella* em todas as marcas é relevante, considerando que esse grupo microbiano compreende espécies que são potenciais patógenos humanos e possivelmente está associado a contaminação pós-pasteurização. Esses microrganismos já foram previamente relatados como contaminantes importantes em diversos produtos lácteos, incluindo o QMF (AHMED e SHIMAMOTO, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2013; GARCÍA-FULGUEIRAS *et al.*, 2001; OKURA e MARIN, 2014). Em estudo realizado por Campos e colaboradores (2006), linhagens de *E. coli* isoladas de amostras de QMF e das mãos de trabalhadores de um laticínio foram consideradas idênticas, sugerindo então contaminação do produto final pela manipulação (CAMPOS *et al.*, 2006).

A utilização de leite *in natura* ou pasteurizado pode ter influência direta sobre a microbiota dos queijos. Já foram observadas diferenças entre as comunidades microbianas de queijos feitos a partir de leite não pasteurizado em comparação com queijos feitos com leite pasteurizado, sugerindo maior diversidade de bactérias em queijos feitos com leite *in natura* (DELCENSERIE *et al.*, 2014). O processamento térmico na cadeia produtiva de laticínios objetiva a segurança microbiológica e evita

contaminação endógena dos alimentos com bactérias potencialmente patogênicas, reduzindo a carga bacteriana (LADO e YOUSEF, 2002). No entanto, a garantia de um leite pasteurizado seguro requer um processo de pasteurização adequado, além da prevenção de contaminação pós-pasteurização (SARKAR, 2015). Embora as amostras de QMF do presente estudo tenham sido produzidas a partir de leite pasteurizado, os dados encontrados sugerem que a cadeia produtiva do QMF está vulnerável à contaminação pós-pasteurização por bactérias potencialmente patogênicas. Estas observações não se restringiram a apenas uma marca de queijo, mas a todas as marcas avaliadas adquiridas em diversas lojas de varejo.

A caracterização da microbiota de queijos usando HTS, possibilita a determinação de uma microbiota central (núcleo) comum entre todas as amostras de queijos avaliadas, a qual é denominada “microbiota *core*” (QUIGLEY et al., 2012; FILIPPIS et al., 2014; FILIPPIS et al., 2017). O presente estudo caracterizou a microbiota core do QMF, revelando a predominância da família *Enterobacteriaceae* entre as OTUs comuns. Essa prevalência pode estar relacionada aos valores de pH, atividade de água e concentrações de NaCl no QMF. A presença desse grupo bacteriano em produtos lácteos é frequentemente associada a más condições sanitárias durante o processo de fabricação, além de serem reconhecidos como deteriorantes em muitos tipos de alimentos (COTON et al., 2012; HADDAD e YAMANI, 2017 ; MØRETRØ E LANGSRUD, 2017). A produção de gases e enzimas lipolíticas e proteolíticas por algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* podem afetar adversamente as características organolépticas do queijo (TABLA et al., 2016).

Em queijos com alto teor de umidade, como o QMF, a ocorrência de alguns grupos microbianos encontrados neste estudo não está preconizada nos requisitos microbiológicos estabelecidos por legislação. Apesar disso, a possibilidade desses grupos apresentarem resistência a antimicrobianos de importância clínica configura um risco adicional, e muitas vezes negligenciado, para a saúde dos consumidores (VERRAES et al., 2013). De fato, a cadeia de produção dos alimentos desempenha um papel crucial na propagação da resistência aos antimicrobianos, à medida que atua como ponte para transferência de bactérias e seus genes de resistência aos antimicrobianos para o meio ambiente, animais e seres humanos (BENGTSSON-PALME, 2017).

Em trabalho anterior, vários genes de resistência aos antimicrobianos foram detectados por PCR a partir do DNA total extraído das mesmas amostras de queijo

utilizadas no presente estudo (PAULA et al., 2018). Alguns desses genes geralmente apresentam forte correlação com os grupos microbianos mais abundantes detectados por HTS. O gene *blaTEM*, um dos principais responsáveis pela produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), foi detectado em 91,4% das amostras avaliadas de QMF. A ocorrência desse gene está fortemente associada a espécies de *Enterobacteriaceae*, sendo codificado principalmente em plasmídeos e elementos genéticos móveis (TEKINER e ÖZPINAR, 2016).

Considerando os principais grupos microbianos detectados por HTS e objetivando aprofundar discussões sobre o papel de QMF na epidemiologia da resistência, o presente estudo também se propôs a avaliar especificamente a ocorrência de bastonetes Gram negativos resistentes aos antimicrobianos. As amostras de QMF foram processadas e cultivadas em meio seletivo MacConkey para recuperação de bastonetes Gram negativos e a caracterização macro morfológica das colônias foi utilizada como forma preliminar para identificar diferentes morfotipos isolados. Cabe ressaltar que a caracterização morfológica não reflete dados de uma identificação de espécies ou grupos, uma vez que uma mesma espécie pode apresentar características morfológicas das colônias distintas (MALAJOVICH, 2015).

A identificação bioquímica presuntiva através da avaliação da fermentação de glicose, sacarose e/ou lactose, produção de CO₂ durante a fermentação da glicose e produção de sulfeto de hidrogênio, permite estimar o gênero dos isolados de bastonetes Gram negativos (Tabela 3) (PROCOP et al., 2017). Essa estimativa sugeriu a ocorrência de gêneros que apresentam importância clínica por serem considerados potencialmente patogênicos ao ser humano, além de apresentarem resistência intrínseca a uma gama de antimicrobianos. O grupo G1, representado por gêneros como *Escherichia*, *Klebsiella* e *Serratia*, foi o mais representativo, com 155 isolados (69%). Espécies bacterianas pertencentes a esses gêneros foram previamente isoladas em amostras de QMF em diversos estudos anteriores, resultados que evidenciam relevância do ponto de vista da segurança microbiológica (CAMPOS et al., 2006; FREITAS et al., 2013; DAMASCENO et al., 2015; SILVA et al., 2023).

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que a resistência à ampicilina foi a mais frequentemente observada tanto no grupo das enterobactérias como nos BGNNF, encontrada em 37% e 76% dos isolados, respectivamente. Melo e colaboradores (2022) relataram que, 100% das amostras analisadas de QMF servido

em um hospital oncológico apresentaram bactérias Gram negativas resistentes a ampicilina. Resultado semelhante foi observado por Silva e colaboradores (2020), que relataram resistência a ampicilina em bactérias Gram negativas de todos os queijos avaliados no estudo, os quais foram adquiridos em varejo. Outros estudos também têm relatado a ocorrência de isolados Gram negativos apresentando ampla resistência a ampicilina em amostra de queijo Minas Frescal industriais (DIAS *et al.*, 2012; CERESER *et al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2019). Embora o uso de ampicilina seja proibido como agente promotor de crescimento na agropecuária brasileira, a seu uso disseminado na medicina humana e veterinária exerce significativa pressão seletiva no contexto de Saúde Única, podendo ser responsável pela prevalência desse fenótipo observado (MAPA, 2009; LI *et al.*, 2019).

A resistência ao sulfazotrim e ampicilina observada em 71% e 76% dos isolados BGNNF, respectivamente, revela alta prevalência de resistência a essas classes de antimicrobianos. Os BGNNF são intrinsecamente resistentes a importantes classes de antimicrobianos como a ampicilina, cefalosporinas, macrolídeos e sulfonamidas (DIENE e ROLAIN, 2013; BATISTA e ESMERINO, 2023). Essa resistência intrínseca deve-se principalmente a permeabilidade reduzida da membrana externa, em comparação com a membrana externa de outras bactérias Gram-negativas. A expressão de bombas de efluxo cromossomais também contribuem significativamente para a resistência intrínseca exibida pelos membros deste grupo. Apesar da possibilidade de haver resistência intrínseca associada, a aquisição de genes de resistência transferidos por elementos genéticos móveis, também têm impulsionado o aumento desses fenótipos entre BGNNF (MCGOWAN, 2006; ANVISA, 2020).

A resistência intermediária foi identificada para ampicilina e tetraciclina em 22% e 1% dos isolados, respectivamente. A definição da categoria intermediária inclui situações em que, no contexto clínico, há alta probabilidade de eficácia terapêutica se a exposição ao antimicrobiano for aumentada por ajuste do regime posológico ou por maior concentração no local da infecção (susceptibilidade dose dependente) (HUMPHRIES, 2021; DÍAS, ROBLES e MOYA, 2022). No entanto, como as taxas de resposta ainda são menores quando comparado a isolados susceptíveis, significando certo grau de incerteza na sua eficácia terapêutica, alguns estudos avaliam dados de susceptibilidade aos antimicrobianos somando a categoria intermediária com a categoria resistente (MELO *et al.* 2022; SILVA *et al.*, 2023). No presente estudo, isso

significaria um aumento na taxa de resistência a ampicilina entre os isolados e a presença de dois isolados considerados resistentes a tetraciclina no grupo das *Enterobacteriaceae*.

Considerando a classificação proposta por Magiorakos e colaboradores (2012), que define o fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos como a não susceptibilidade a pelo menos um agente de três ou mais classes antimicrobianas, não foram encontrados isolados com perfil de multirresistência no presente estudo (MAGIORAKOS et al., 2012). Em contrapartida, outros estudos já relataram a ocorrência de bactérias Gram negativas multirresistentes em amostras de QMF (DAMASCENO et al., 2015; MELO et al., 2022). De forma geral, os isolados deste trabalho demonstraram ausência ou baixos níveis de resistência a alguns antimicrobianos em comparação com outros estudos. Melo e colaboradores (2022) detectaram altos níveis de resistência a antimicrobianos como cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ceftazidima e ertapenem em bactérias Gram-negativas de QMF. Apesar disso, as amostras de queijos analisadas no presente estudo ainda demonstraram ser potenciais veículos de microrganismos resistentes a antimicrobianos de relevância clínica.

A presença do gene *int11*, que codifica a integrase dos integrons de classe 1, foi investigada entre isolados que apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos testados. A detecção em apenas três isolados bacterianos contrasta com dados obtidos em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, onde uma alta prevalência do gene *int1*, além de genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos, foram detectados no metagenoma de amostras de QMF utilizando técnica de PCR (PAULA et al., 2018). No entanto, vale ressaltar que abordagens independentes de cultivo, envolvem métodos moleculares baseados na detecção de DNA, os quais abrangem microrganismos subdominantes ou difíceis de cultivar *in vitro*, além de serem capazes de detectar ácidos nucleicos de células não viáveis (JONNALA et al., 2018; WALSH, et al., 2020).

Elevadas taxas de resistência a ceftazidima já foram anteriormente relatadas em bactérias Gram-negativas de QMF (MELO et al. 2022; SILVA et al, 2023). Embora apenas um isolado no presente estudo tenha apresentado resistência a ceftazidima, a relevância desse fenótipo impulsionou a sua identificação prévia utilizando sistema automatizado Vitek2, o qual foi identificado como *Acinetobacter ursingii* e confirmado pelo sequenciamento completo do seu genoma.

Acinetobacter ursingii é um patógeno oportunista raro, associado principalmente a quadros de bacteremia em pacientes imunocomprometidos e outras infecções nosocomiais (NEMEC *et al.*, 2001; LOUBINOX *et al.*, 2003). Isolados apresentando resistência a diversos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos já foram descritas em alguns estudos (DORTET *et al.*, 2006; HORII *et al.*, 2011; CHIU *et al.*, 2015; FACCONI *et al.*, 2019).

Embora mais comumente associada a amostras clínicas, a presença de *Acinetobacter ursingii* também já foi relatada em outros tipos de amostras, como carne de porco e leite de cabra. Li e colaboradores (2016) isolaram *A. ursingii* em amostras de carne de porco na China, o qual era portador do gene *blaTEM*, responsável por codificar ESBL (LI *et al.*, 2016). Ramos e Nascimento (2019) analisaram 21 amostras de leite de cabra adquiridas diretamente de produtores de diversas regiões do estado do Rio de Janeiro. Dez isolados de *Acinetobacter spp.* foram obtidos e três identificados como *A. ursingii*, dos quais dois foram caracterizados como produtores de ESBL, e um como produtor de carbapenemase (gene KPC) (RAMOS e NASCIMENTO, 2019). No entanto, não há relatos sobre a detecção dessa espécie em amostras de queijos, especialmente apresentando resistência aos antimicrobianos.

Algumas características genômicas obtidas pelo sequenciamento do genoma de *A. ursingii* isolado de QMF foram semelhantes as características do estudo realizado por Palkova e colaboradores (2018), o qual relatou um tamanho de genoma de 3,5 Mb, 3226 genes codificadores de proteínas, 78 genes de RNA, 40% de conteúdo GC (PALKOVA, MINARIK e SOLTYS, 2018).

Com relação a detecção de genes de resistência, embora a presença de genes relacionados a produção de beta-lactamases e carbapenemases já tenha sido descrita no genoma de *A. ursingii* em outros estudos (PALKOVA, MINARIK e SOLTYS, 2018; HENDRICKX *et al.*, 2022), a análise preliminar do presente trabalho detectou apenas o gene *ant(3'')-IIC*.

Os genes tipo *ant* (aminoglicosídeo nucleotidiltransferase) são amplamente encontrados em regiões cromossômicas conservadas no gênero *Acinetobacter*, e estão associados a produção de enzimas que modificam os aminoglicosídeos, conferindo resistência a essa classe de antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2017). A ausência do fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos testados no teste de susceptibilidade, pode estar associada à falta de expressão gênica ou a uma eventual

mutação que tornou o gene não funcional. Destaca-se ainda, a ausência da detecção de genes específicos relacionados ao fenótipo de resistência a ceftazidima encontrado no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. A base genética da resistência à ceftazidima é complexa e multifatorial, podendo estar associada não apenas presença de genes que conferem a superexpressão de bombas de efluxo e β -lactamases AmpC, mas também a mutações relacionadas ao alvo do antimicrobiano (PBPs) e até mesmo deleções no genoma (KOS, MCLAUGHLIN e GARDNER, 2016; SANZ-GARCÍA, HERNANDO-AMADO e MARTÍNEZ, 2018; RAMSAY *et al.*, 2023). Dessa forma, são necessárias novas análises genômicas voltadas para a caracterização de mutações e deleções no genoma do isolado de *A. ursingii*, elucidando a hipótese de que o fenótipo de resistência a ceftazidima observado pode ser resultado de tais alterações genéticas.

O sequenciamento completo do genoma de 2 isolados previamente positivos para o gene *int1* (Q2 e Q3) gerou a identificação a nível de espécie para o isolado Q2 (*Pseudomonas juntendii*) e a nível de gênero para Q3 (*Pseudomonas* spp.). Tohya e colaboradores (2019) foram os primeiros a realizar uma identificação sistemática de *P. juntendi* isolada de amostra de escarro de um paciente no Japão, nomeando oficialmente esta espécie (TOHYA *et al.*, 2019). A ocorrência dessa espécie em alimento é rara, tendo sido relatada apenas em amostras de molho de tempero à base de tremoço, na Alemanha (LÜLF *et al.*, 2023). No entanto, a recente reidentificação baseada na identidade média de nucleotídeos (ANI) de isolados anteriormente identificados como *Pseudomonas putida* (MARIMOTO *et al.*, 2020; GIRARD *et al.*, 2021; TOHYA *et al.*, 2022), pode sinalizar que a ocorrência de *P. juntendi* em amostras de alimentos foi até então, subestimada.

Zheng e colaboradores (2022) analisaram informações de 14 linhagens isoladas de amostras clínicas anotadas como *P. juntendi* no GenBank, e relataram tamanho do genoma variando entre 5,42 a 6,2 Mb e conteúdo GC em torno de 62%, valores que se assemelham aos dados do presente estudo. Os genes tipo *mex* e *CpxR* detectados no genoma dos isolados identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, estão relacionados a expressão e regulação de bombas de efluxo, respectivamente (ALCOCK, 2023). Os sistemas de efluxo podem ser responsáveis pela resistência a várias classes de antimicrobianos quimicamente distintos, sendo este o mecanismo provável relacionado aos fenótipos de resistência a ampicilina e sulfazotrim encontrados no teste de susceptibilidade para esses isolados.

A família de bombas de efluxo do tipo RND (*Resistance Nodulation Division*) contribui significativamente para a resistência intrínseca em *Pseudomonas spp.*, sendo já identificados doze sistemas de efluxo da família RND em genomas desse gênero bacteriano (DREIER e RUGGERONE, 2015). A estrutura desse sistema é composta por três proteínas diferentes: uma proteína de fusão localizada no espaço periplasmático, como MexA, MexX, MexC, MexE, MexJ e MexV; uma proteína transportadora inserida na membrana citoplasmática e que desempenha o papel de bomba, como MexB, MexY, MexD, MexF, MexK e MexW; e proteínas de membrana externa ou porinas, que formam o canal de extrusão, como OprM, OprJ ou OprN. (AESCHLIMANN, 2003; LORUSSO *et al.*, 2022). Os genes de resistência detectados no presente estudo estão relacionados a expressão das proteínas constituintes desses sistemas. Em concordância com esses dados, genes do tipo *mex* foram previamente detectados por PCR a partir do DNA total extraído de amostras de QMF (PAULA *et al.*, 2018).

Embora o sequenciamento completo dos genomas selecionados tenha revelado ausência de plasmídeos, a detecção prévia de integron de classe 1 por PCR nos isolados Q2 (*P. juntendi*) e Q3 (*Pseudomonas spp.*) sinaliza o potencial de mobilidade gênica nas bactérias avaliadas, considerando que esses elementos podem integrar genes de resistência a antimicrobianos, expressá-los e disseminá-los entre as bactérias. Análises referentes aos aspectos estruturais e evolutivos do integron de classe 1 desses isolados serão realizadas em estudos posteriores, elucidando a presença de cassetes gênicos e sua possível associação com os fenótipos de resistência observados no teste de susceptibilidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização da composição da microbiota do QMF utilizando HTS, destacou a alta abundância de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* em todas as marcas de queijo e a baixa incidência de BAL, bem como uma microbiota central comum com predominância da família *Enterobacteriaceae*. Em geral, estas informações podem ser importantes na busca de estratégias para otimizar a qualidade e segurança do QMF, reforçando o seu valor comercial.

Estudos anteriores têm demonstrado que o QMF pode atuar como reservatório de bactérias potencialmente patogênicas que carregam genes de resistência aos antimicrobianos. Essa observação foi ratificada pelos resultados relatados na segunda parte do presente trabalho, que demonstrou o isolamento de bactérias Gram negativas resistentes a antimicrobianos de relevância clínica, bem como portadoras de integrons de classe 1. A identificação por sequenciamento completo do genoma das espécies *Acinetobacter ursingii* e *Pseudomonas juntendi*, ainda não relatada anteriormente em queijo Minas Frescal, destacam a relevância da vigilância epidemiológica de patógenos não clássicos em amostras de alimentos, principalmente devido ao potencial desses microrganismos de apresentar mecanismos de resistência a antimicrobianos clinicamente importantes.

De forma geral, a presença dos grupos microbianos relatados no QMF sugere um risco adicional para os consumidores e levanta questões a respeito de segurança microbiológica. Como mencionado, esses microrganismos podem atuar como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos e esses genes podem ser mobilizados e transferidos entre animais, seres humanos e meio ambiente. O papel da cadeia de produção de alimentos na disseminação da resistência antimicrobiana destaca a importância de uma abordagem multissetorial integrada e holística, baseada no contexto de Saúde Única, na luta contra este importante problema de saúde pública.

CONCLUSÃO

- O sequenciamento da microbiota do QMF destacou a alta abundância de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* em todas as marcas de queijo e baixa incidência de bactérias lácticas;
- A microbiota central comum (*core*) das amostras apresentou predominância de membros da família *Enterobacteriaceae*;
- Embora bactérias Gram negativas MDR não tenham sido isoladas nas amostras de QMF avaliadas, foi observada a ocorrência de bactérias com fenótipo de resistência à antimicrobianos de interesse clínico e veterinário, como ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima e sulfazotrim;
- O sequenciamento completo do genoma de três isolados selecionados levaram a identificação das espécies *Acinetobacter ursingii* e *Pseudomonas juntendi*, ainda não relatadas em QMF;
- Genes associados a resistência aos amiglicosídeos e expressão de bombas de efluxo foram identificados nos genomas de *Acinetobacter ursingii* e *Pseudomonas juntendi* / *Pseudomonas spp.*, respectivamente.
- Análises adicionais são necessárias para elucidar as características genômicas associadas aos fenótipos de resistência encontrados no teste de susceptibilidade, bem como para caracterizar a estrutura de integrons de classe 1 detectados previamente por PCR convencional.

REFERENCIAS

- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2021. **Mercado global de queijos bate recorde em 2019**. Disponível em: [https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2373&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5#:~:text=Os%20Estados%20Unidos%20\(com%206,com%203%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas](https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2373&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5#:~:text=Os%20Estados%20Unidos%20(com%206,com%203%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas). Acesso em: 27/11/2022.
- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2022. **Indústria de queijos: como continuar crescendo?** Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2448&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=29#:~:text=Contudo%2C%20al%C3%A9m%20da%20quest%C3%A3o%20da,12%20quilos%20anuais%20per%20capita. Acesso em: 27/11/2022.
- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- ABREU, A. C. S. *et al.* Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal Cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. **International Dairy Journal**, v. 122, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105139>
- AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 7, p. 916-924, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1592/phco.23.7.916.32722>.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **Int J Food Microbiol.**, v. 168-169, p. 57-62, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.014>
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36; n. 6, p. 697-705, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- ALCOCK *et al.* CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, v. 51, p. 690-699, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>.
- ALMEIDA, K. E.; TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT**, v. 41, n. 2, p. 311–316, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.021>
- ALVES, C. C. C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e acidificação direta com ácido láctico**. 2010. 81f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010. Disponível em:

[http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/Clara_Calil .pdf](http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/Clara_Calil.pdf). Acesso em: 15 out. 2022.

AMORIM, A. L. B. C. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364–367, nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.18241/0073-98552014731628>

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de betalactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017. Disponível em: <http://jicabih.com.br/index.php/jic/article/view/173>.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. Brasília, 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância em Saúde. **Resolução RDC nº 12/2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2855866&_101_type=document

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância em Saúde. **Instrução normativa nº 161**. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i6.290>

ARAÚJO, V. S. *et al.* Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J Appl Microbiol.**, v. 92, n. 6, p. 1172 – 1177, 2002. Disponível em: <https://doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01656.x>.

ARCURI, E. F. *et al.* Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR e DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**, v. 30, p. 1–6, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.007>

- ARSLAN, S.; EYI, A.; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* isolated from cheeses. **J Dairy Sci.**, v. 94, n. 12, p. 5851-5856, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4676>
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays Biochem**, v. 61, n. 1, p. 49-59, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>
- ASLAM, B. *et al.* Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>.
- BAQUERO, F. *et al.* Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, dec. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02892>
- BAKER, S. *et al.* Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science**, v. 360, p. 733-738, may. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aar3777>.
- BATISTA, T. D.; ESMERINO, L. A. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções cutâneas. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 4, p. 17959–17969, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n4-309>
- BLAIR, J. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p.42–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- BLANCO-PICAZO, P. *et al.* Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a nut-based milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 367, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590>.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114 – 2120, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-isbn.pdf/view>
- BRITO, J. R. F. *et al.* Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4954–4961, aug. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01828-07>
- BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. MINAS LEITE. 2., 2000, Juiz de Fora. **Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira**:

anais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 83-94, 2000.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clin Microbiol Rev.**, v. 33, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>. PMID: 32102899; PMCID: PMC7048014.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrins. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 141–166, aug. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>

CAMPOS, M.R.J.H. *et al.* Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400027>

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 11–48, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>.

CAPORASO, J. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, p. 335–336, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262–267, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.005>

CARVALHO, L. G. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 3, p. 575–580, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12783>

CASTRO, A. *et al.* Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 153–160, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.08.001>

CERESER, *et al.* Resistance profile of *Aeromonas spp.* isolated in dairy products industry. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 1, p. 30-36, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n1p30-36>

CEUPPENS, S. *et al.* Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 551-577, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12072>

CHAVES, A. C. S. D. *et al.* Queijos artesanais brasileiros. **Embrapa: SEBRAE**, 15 p., 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-artesanaisbrasileiros.pdf>. Acesso em: 24 de outubro de 2023.

CHIU, C. H. *et al.* A retrospective study of the incidence, clinical characteristics, identification, and antimicrobial susceptibility of bacteremic isolates of *Acinetobacter*

ursingii. **BMC Infect Dis**, v.15, n. 400, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1145-z>

CHOI, J. *et al.* Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4026–4042, may. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>

COLLIGNON, P. C. *et al.* World health organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. **Clinical Infection Disease**, v. 63, p. 1087–1093, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw475>

COLLINEAU, L. *et al.* Integrating whole-genome sequencing data into quantitative risk assessment of foodborne antimicrobial resistance: A review of opportunities and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 1107, may 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01107>

COTON, M. *et al.* Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. **Food Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 88 – 98, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.020>

DAMACENO, H. F. B. *et al.* Antibiotic resistance versus antimicrobial substances production by gram-negative foodborne pathogens isolated from minas frescal cheese: Heads or tails? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 297–301, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1876>

DANTAS, A. B. *et al.* Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.1, p.18–30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9880>

DAPKEVICIUS, M. D. L. E; *et al.* Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A Comprehensive Review of Their Multiple Roles. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 821, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10040821>.

DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417-33, set. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.

DENG, Y. *et al.* Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 45, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

DIAS, B. F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/1211>

DIAS, M. T. *et al.* Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Food Sci. Technol.**, v. 32, n. 4, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000059>.

DÍAZ, S. G. N.; ROBLES, O. A.; MOYA, J. M. G. New definitions of susceptibility categories EUCAST 2019: clinic application. **Rev Esp Quimioter.**, v. 35; n. 3, p. 84-88, 2022. Disponível em: <https://10.37201/req/s03.18.2022>

DIENE, S. M.; ROLAIN, J. M. Investigation of antibiotic resistance in the genomic era of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, especially Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 11, n. 3, p. 277-296, 2013. Disponível em: <https://doi:10.1586/eri.13.1>.

DORTET, L. *et al.* Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. **J Clin Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4471-4478, 2006. Disponível em: <https://doi:10.1128/JCM.01535-06>.

DREIER, J.; RUGGERONE, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 660, 2015. Disponível em: <https://doi:10.3389/fmicb.2015.00660>. PMID: 26217310; PMCID: PMC4495556.

EDGAR, R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nat Methods**, v. 10, p. 996–998, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário do Leite 2018:** indicadores e tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>. Acesso em: 02 de março de 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário do leite 2021: saúde única e total.** 102 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite2021.pdf>. Acesso em: 24 out. 2023.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **.Queijo Minas Frescal.** Brasília, 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11884/2/00076200.pdf>. Acesso em: 31 de novembro 2022.

ERCOLINI, D. Secrets of the cheese microbiome. **Nature Food**, v. 1, n. 8, p. 466–467, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0131-9>

ERGINKAYA, Z.; TURHAN, E. U.; TATLI, D. Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. **Iran. J. Vet. Res.**, v. 19, pp. 53-56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4769>

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; BARUCH, M. Q. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food**

Microbiology, v. 57, p. 116–127, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>

ESCUADERO, J. A. *et al.* The Integron: Adaptation On Demand. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>

FACCONE, D., *et al.* Multiple clones of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter ursingii* in a children hospital from Argentina. **Infect Genet Evol.**, v. 67, p. 145-149, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.011>

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. **Rev Sci Tech.**, v. 25, n. 2, p. 555-569, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20506/rst.25.2.1682>.

FLÓREZ, A. B. *et al.* Directed recovery and molecular characterization of antibiotic resistance plasmids from cheese bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22157801>

FLÓREZ, A. B. *et al.* Molecular identification and quantification of tetracycline and erythromycin resistance genes in Spanish and Italian retail cheeses. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, sep. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/746859>

FLÓREZ, A. B.; VÁZQUEZ, L.; MAYO, B. A functional metagenomic analysis of tetracycline resistance in cheese bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 907, p. 1–12, may. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00907>

FONTES, C. O. *et al.* 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, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12088>

FRAQUEZA, M. J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p. 76–88, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>.

FREITAS, R. *et al.* Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 11, p. 951–955, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1525>

FRIEDMAN, M. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. **J Agric Food Chem.**, v. 63, n. 15, p. 3805-3822, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00778>.

FURTADO, D. N. *et al.* Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh

Minas-type goat cheese. **Brazilian journal of microbiology**, v. 46, n. 1, p. 201–206, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130761>

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. 3ª edição. São Paulo: Setembro Editora, 2017.

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 207, p. 15-21, 1980.

GAŁAŻKA, A. *et al.* Genetic and Functional Diversity of Bacterial Microbiome in Soils With Long Term Impacts of Petroleum Hydrocarbons. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1923, p. 1–17, aug. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01923>

GARCIA-FULGUEIRAS, A. *et al.* A large outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis associated with consumption of fresh pasteurised milk cheese. **Eur J Epidemiol.**, v. 17, n. 6, p. 533-538, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1014504305666>

GHALY, T. M. *et al.* Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–10, jan 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004>

GILLINGS, M. R. Integrons: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257–277, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>

GILLINGS, M. R. Class 1 integrons as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.002>.

GIRARD, L. *et al.* The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: Bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.3, p. 197-205, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1222>.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

HAMMAD, A. M.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus spp.* in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food**

Control, v. 50, p. 815 – 820, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.020>.

HASSANI, S., *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk. **Scientific Reports**, v. 12, n. 3878, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07845-6>

HENDRICKX, A. P. A. *et al.* Comparative analysis of IMP-4- and OXA-58-containing plasmids of three carbapenemase-producing *Acinetobacter ursingii* strains in the Netherlands. **Journal Global of Antimicrobial Resistance**, v. 31, p. 207-211, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.09.006>

HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Public Health**, v.7, p. 1-17, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00242>

HORII T., *et al.* Blood stream infections caused by *Acinetobacter ursingii* in an obstetrics ward. **Infect Genet Evol.**, v. 11, n. 1, p. 52-56, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.10.011>.

HUMPHRIES, R. M. Re-Exploring the Intermediate Interpretive Category. **CLSI AST News Update**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: https://clsi.org/media/3mrkwh4j/ast-news-update-volume-6-issue-1-april-2021_5-17-21.pdf. Acesso em: 13 de out. 2023.

HUNT, M. *et al.* ARIBA: Rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 10, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>

HURTADO, R. *et al.* WGS-Based Lineage and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella Typhimurium* Isolated during 2000–2017 in Peru. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091170>.

İSPIRLI, H.; DEMİRBAŞ, F.; DERTLİ, E. Characterization of functional properties of *Enterococcus spp.* isolated from Turkish white cheese. **LWT**, v. 75, p. 358-365, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.010>.

JANS, C. *et al.* Consumer exposure to antimicrobial resistant bacteria from food at Swiss retail level. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00362>

JAY, J. **Microbiologia de alimentos**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JIN, H. *et al.* Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6885–6896, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14403>

JONES-DIAS, D. *et al.* Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrins from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1400, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01400>

JONNALA, B. R. Y. *et al.* Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1020, p. 1-12, may. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>.

KAHLMETER, G. *et al.* European Harmonization of MIC Breakpoints for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 52, n. 2, p. 145–148, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg312>

KAPOOR, G., SAIGAL. S., ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.

KIRBIS, A.; KRIZMAN, M. Spread of Antibiotic Resistant Bacteria from Food of Animal Origin to Humans and Vice Versa. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 148–151, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.043>

KONEMAN, E., *et al.*, **Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Guanabara Koogan, 6. ed. Rio de Janeiro, 2014.

KOS, V. N.; MCLAUGHLIN, R. E.; GARDNER, H. A. Elucidation of Mechanisms of Ceftazidime Resistance among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by Using Genomic Data. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3856 – 3861, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.03113-15>.

KOSTYANEV, T.; CAN, F. Chapter 1 - The Global Crisis of Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Stewardship**, p. 3-12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810477-4.00001-5>.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annu Rev Food Sci Technol.**, v. 7, p. 287-312, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033251>.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Dis.** v. 13, n. 12, p. 1057-98, dec. 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).

LEKSHMI, M. *et al.* The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010011>.

LEVY, S.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, p.122-129, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1145>

LI, L. *et al.* Antimicrobial Resistance and Resistance Genes in Aerobic Bacteria Isolated from Pork at Slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 589-597, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-455>.

LI, M. *et al.* The resistance mechanism of *Escherichia coli* induced by ampicillin in laboratory. **Infect Drug Resist.**, v 12, p. 2853-2863, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IDR.S221212>

LI, Y. *et al.* Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from retail foods in northern Xinjiang, China. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 2035–2051, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1491>

LIU, Y. X. *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein Cell**, v. 12, n. 5, p. 315-330, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>

LORUSSO, A. B. *et al.* Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Science**, v. 23, n. 24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>

LOSASSO, C. *et al.* Assessing the Influence of Vegan, Vegetarian and Omnivore Oriented Westernized Dietary Styles on Human Gut Microbiota : A Cross Sectional Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00317>

LOUBINOX J., *et al.* Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 1337-1338, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1337-1338.2003>.

LÜLF, R. H. *et al.* Carbohydrate Sources Influence the Microbiota and Flavour Profile of a Lupine-Based Moromi Fermentation. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 197, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12010197>

LUSK, T. S. *et al.* Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 254, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-254>

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection** v. 18, n. 3, p. 268–281, 1 mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146/1996**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília: MAPA, 1996. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=11/03/1996&jornal=1&pagina=25&totalArquivos=101>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 352/1997**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Brasília, Distrito Federal: MAPA, 1997. Disponível em: <https://sidago.agrodefesa.go.gov.br/site/adicionaispropios/protocolo/arquivos/409853.pdf>

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº4**. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas

Frescal. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, 2004. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=05/03/2004&jornal=1&pagina=5&totalArquivos=120>

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 1**. Proíbe, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385>

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26**. Aprovar o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/copy_of_INSTRUONORMATIVAN26DE9DEJULHODE2009.pdf

MORIMOTO Y. *et al.* Re-identification of strains deposited as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in GenBank based on whole genome sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5958-5963, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004468>

MARTIN, A.; BEUTIN, L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n.1, p. 99-104, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.041>.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>.

MELO, F. M. *et al.* Antimicrobial resistance of the microbiota of cheeses served in an oncology hospital in Rio de Janeiro-Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34837>.

MCARTHUR, A. G.; TSANG, K. K. Antimicrobial resistance surveillance in the genomic age. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1388, n. 1, p. 78–91, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.13289>

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>.

MCGOWAN, J. E. J. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **American Journal of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 29-37, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.226>.

MENEZES, M. F. *et al.* Microbiota E Conservação Do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 76–89, mai. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/2236117013033>

MESSIAS, T. B. O. N. *et al.* Typical Brazilian cheeses: safety, mineral content and adequacy to the nutritional labeling. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.37121>

MILKPOINT. **ABIQ: Mercado de Queijos tem Alto Potencial de Crescimento no Brasil**. 2017. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/gironoticias/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil105515n.aspx> Acesso em: 25 out. 2023.

MINAS GERAIS. Lei nº 20549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Revoga a Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. **Diário do Executivo**: Belo Horizonte, MG, 2012.

MONTE, D. F. *et al.* Current insights on high priority antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in food and foodstuffs: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 35–46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.004>

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1022–1041, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>

MURPHY, S. C. *et al.* Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, p. 629-655, 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

NEMEC, A., *et al.* *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 51, p. 1891-1899, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1891>.

NIHR - Global Health Research Unit on Genomic Surveillance of AMR. Whole-genome sequencing as part of national and international surveillance programmes for antimicrobial resistance: a roadmap. **BMJ Global Health**, v. 5, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-002244>

NUNES, M. *et al.* Qualitative analysis of microbiological reports of Minas Frescal Cheese observed in a dairy from 2017 to 2020 in the municipality of Dourados-MS.

International Journal of Advanced Engineering Research and Science, v. 8, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.22161/ijaers.84.35>

NUNES, R. S. C. *et al.* 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. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2015-9693>

OGAWA, V. A. *et al.* Prioritizing a One Health Approach in the Immediate Fight Against Antimicrobial Resistance. **EcoHealth**, v. 16, n. 3, p. 410–413, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1325-6>

OKURA, M. H.; MARIN, J. M. Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1506-1511, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131237>

OMS - Organização Mundial da Saúde. **A European One-Health action plan against antimicrobial resistance (AMR)**. Brussels, 2017. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf. Acesso em: 5 de janeiro de 2023.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance**. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011007>. Acesso em: 06 de março de 2023.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**, 2016. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

ONICIUC, E. A. *et al.* The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 1-28, mai. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes9050268>

PALKOVA, L.; MINARIK, G.; SOLTYS, K. Draft Genome Sequencing of an *Acinetobacter ursingii* Isolate from Healthy Human Skin, Carrying Multidrug Resistance Genes. **Genome Announcements**, v. 6, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00394-18>

PARTRIDGE S. R., *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clin Microbiol Ver**, v. 31, n. 4, aug. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>.

PAULA, A. C. L. *et al.* Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrations in White Soft Cheese : Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene

Transfer. **Genes**, v.9, n. 2, feb. 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.3390/genes9020106>

PENESYAN, A., GILLINGS, M., PAULSEN, I.T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>.

PEREIRA, R. B. **Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros**. 2007. 31p. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PERIN, L. M. *et al.* Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis subsp. lactis* GLc05. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 159–167, dez. 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006>

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>

PERRY, J. A.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00138>

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova.**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000200020>

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDENCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 1, p. 77-85, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500013>

PINTO, M. S. *et al.* Segurança alimentar do queijo minas artesanal do serro, minas gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009. Disponível em:
<https://revistas.ufg.br/pat/article/view/4509>. Acesso em: 6 jun. 2022.

PIRES, B. A. D. *et al.* Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. **Vigil Sanit Debate**, v. 7, n. 3, p. 86–91, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.22239/2317-269X.01296>

PLANÝ, M. et al. Metagenomic Analysis of Slovak Bryndza Cheese Using Next-Generation 16S rDNA Amplicon Sequencing. **Nova Biotechnologica Et Chimica**, v. 15, n. 1, p. 23–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0003>

PROCOP, G. W. et al. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7th. ed. [S.l.]: Wolters Kluwer, 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 590 – 596, 2013. Disponível em: <https://doi:10.1093/nar/gks1219>

QUIGLEY, L. et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. **Appl Environ Microbiol.**, v. 78, n. 16, p. 5717-5723, 2012. Disponível em: <https://doi:10.1128/AEM.00918-12>.

QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

QUINTIERI, L.; FANELLI, F.; CAPUTO, L. Antibiotic Resistant *Pseudomonas Spp.* Spoilers in Fresh Dairy Products: An Underestimated Risk and the Control Strategies. **Foods**, v. 8, n. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods8090372>

RAMOS, G. L. P. A.; NASCIMENTO, J. S. Characterization of *Acinetobacter spp.* from raw goat Milk. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190404>

RAMSAY, K. A. et al. Ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is multigenic and complex. **PLoS One**, v. 18, n. 5, 2023. Disponível em: <https://doi:10.1371/journal.pone.0285856>.

RAVI, A. et al. Integrins in the Intestinal Microbiota as Reservoirs for Transmission of Antibiotic Resistance Genes. **Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 238–248, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens3020238>

REHMAN, M. U. et al. Characteristics of Integrins and Associated Gene Cassettes in Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Free-Ranging Food Animals in China. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1902-1907, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13795>.

RESENDE, J. A. et al. 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, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14019>

REUBEN, R. C. et al. Universal drivers of cheese microbiomes. **iScience**, v. 26, n. 1, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105744>

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, jun 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.

RICHTER, M. *et al.* JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

RIQUELME, C. *et al.* Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 86 – 94, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.031>.

ROCHA, G. L. **Influência do tratamento térmico no valor nutricional do leite fluido**. 2004. 44p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos). Departamento de Matemática e Física - Universidade Católica de Goiá, Goiânia, 2004.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000200016>

ROSSEN, J. W. A.; FRIEDRICH, A. W.; MORAN-GILAD, J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 355-360, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.001>

SABINO, Y. N. V. *et al.* Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>

SAMTIYA, M. *et al.* Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. **Foods**, v. 11, n. 19, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11192966>

SANDERSON, H. *et al.* Antimicrobial Resistant Genes and Organisms as Environmental Contaminants of Emerging Concern: Addressing Global Public Health Risks. **Management of Emerging Public Health Issues and Risks**, p. 147-187, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813290-6.00007-X>

SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J. L. Mutation-Driven Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of either Ceftazidime or Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 62, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01379-18>.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Série Mercado - Queijos Nacionais: estudos de Mercado**. 2008, 150p. Disponível em: https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/%24File/NT0003909A.pdf. Acesso em: 06 de setembro de 2022

SEKSE, C. *et al.* High Throughput Sequencing for Detection of Foodborne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02029>

SHEU, C. *et al.* Infections Caused by Enterobacteriaceae : An Update on Therapeutic Options. **Front Microbiol**, v. 10, ja. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>

SILVA, A. C.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N. C. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 347–356, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1>

SILVA, C. B. *et al.* Microbiological quality and cultivable bacterial community of fresh and ripened Minas cheeses made from raw and pasteurised milk. **International Dairy Journal**, v. 143, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105662>.

SILVA, C. R. *et al.* Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430–440, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.35460>

SILVA, F. R. *et al.* Conservação e controle de qualidade de queijos : Revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 4, p. 333–341, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/PUBVET.V11N4.333-341>

SILVA, L. F. B.; BORTOLUCI, F.; VIVAN, A. C. P. Análise microbiológica de queijos tipo Minas Frescal oriundos de diferentes formas de produção. **Salusvita**, v. 38, n. 2, p. 329-343, 2019. Disponível em: https://secure.unisagrado.edu.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v38_n2_2019/salusvita_v38_n2_2019_art_06.pdf

STELLATO, G. *et al.* Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. **Appl Environ Microbiol.**, v. 81, n. 22, p. 7893-7904, 2015. Disponível em: <https://doi: 10.1128/AEM.02294-15>

SULLIVAN, D. J. *et al.* Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. **Appl Environ Microbiol.**, v. 81, n. 7, p. 2525 – 2533, 2015. Disponível em: <https://doi: 10.1128/AEM.04054-14>

TAN, B. F. *et al.* Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: Current progress, challenges, and future opportunities. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>

TAN, S. L.; LEE, H. Y.; MAHYUDIN, N. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. **Food Control**, v. 44, p. 203-207, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.008>.

TAO, S. *et al.* The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. **Canadian Journal of Infection Disease and Medical Microbiology**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>

TILOCCA, B. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

TOHYA, M. *et al.* *Pseudomonas juntendi* sp. nov., isolated from patients in Japan and Myanmar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 3377-3384, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003623>

TOHYA, M. *et al.* Whole-Genome Sequencing-Based Re-Identification of *Pseudomonas putida/fluorescens* Clinical Isolates Identified by Biochemical Bacterial Identification Systems. **Microbiol Spectrum**, v. 10, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02491-21>

TOMISLAV, K.; CAN, F. The Global Crisis of Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Stewardship**, p. 3-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810477-4.00001-5>.

UDDIN, T. M., *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

USDA - United States Department of Agriculture. **Dairy: world markets and trade**. World Production, Markets, and Trade Report, 2023. Disponível em <https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>. Acesso em: 21 de outubro de 2023.

WALSH, C., Antibiotics: actions, origins, resistance. **Protein Science**, v. 13, n. 11, p. 3059 - 3060, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1110/ps.041032204>.

WANG, K. *et al.* Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. **J. Agric. Food Res.**, v. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100006>

WIND, L. L. *et al.* Finding What Is Inaccessible: Antimicrobial Resistance Language Use among the One Health Domains. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 385, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040385>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **PT.**, v. 40, n. 4, p. 277-283, apr. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/pdf/ptj4004277.pdf>

VERRAES, C. *et al.* Antimicrobial resistance in the food chain: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2643–2669, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>.

WALL, S. Prevention of antibiotic resistance - an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps. **Glob Health Action**, v. 12, n. 1, dec. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1756191>.

WALSH, A. M. *et al.* Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. **Nature Food**, v. 1, n. 8, p. 500–510, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0129-3>

WALSH, A. M. *et al.* Translating Omics to Food Microbiology. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 113–134, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025729>

WALTHER, B. *et al.* Cheese in nutrition and health. **Dairy Science & Technology**, v. 88, p. 389 – 405, jul. 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1051/dst:2008012>

WANG, F.; ZHANG, W. NIU, D. Editorial: Foodborne Enterobacteriaceae of Animal Origin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://doi: 10.3389/fcimb.2021.772359>

ZHANG, G. *et al.* A new subclass of intrinsic aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT(3'')-II, is horizontally transferred among *Acinetobacter spp.* by homologous recombination. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 2, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1371/journal.pgen.1006602>.

ZHANG, Z. *et al.* Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. **Nature Communication**, v. 13, n. 1, p. 1553, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022->

ZHENG, L. *et al.* A clinical *Pseudomonas juntendi* strain with blaIMP-1 carried by an integrative and conjugative element in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi: 10.3389/fmicb.2022.929800>

ANEXO A – Artigo publicado na revista Food Science and Technology

LWT - Food Science and Technology 139 (2021) 110791



Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Microbiome of industrialized Minas Frescal Cheese reveals high prevalence of putative bacteria: A concern in the One Health context

A.C.L. de Paula^a, Julliane Dutra Medeiros^a, G.R. Fernandes^b, V.L. da Silva^a,
Cláudio Galuppo Diniz^{a,*}

^a Laboratory of Bacterial Physiology and Microbial Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Biosystems Informatics and Genomics Group, Rene Rachau Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cheese microbiota
Minas frescal cheese
Food spoilage
Microbial ecology

ABSTRACT

The knowledge about microbiota from cheeses plays a key role in safety improvement and quality enhancement of the final product. We used a high throughput sequencing methodology to provide insights into the microbial composition of Minas Frescal Cheese (MFC). The results obtained from the analysis of 28 cheese samples showed that cheeses were brand-clustered, exhibiting unique bacterial profiles which varied in diversity and abundance of taxa. Proteobacteria dominated in all samples, corresponding to a mean of 88.7% from all sequences. Groups associated with contamination, as *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Vibrio* were highly frequent in most of brands. Low abundance of lactic acid bacteria was also observed. The core microbiome shared by 100% of the samples indicated predominance of Enterobacteriaceae family. Our data point to a concern regarding the occurrence of potential spoilage microbiota and opportunistic pathogens in cheeses. This metataxonomic study suggests correlations between putative bacteria and antimicrobial resistance phenomenon in foodstuff, as already reported for MFC. Together these data highlight that productive chain of MFC might be related to spread of medically important bacteria, which are underestimated for their possible impact on human health. The observations may also reinforce the importance of food safety regulations facing the One Health point of view.

1. Introduction

Cheese is a dairy product which has played an important role in human feeding behavior. Considering the regional, social and economic importance of the unprocessed-cheese market into the growing dairy industry, Minas Frescal Cheese (MFC) figures as a popular and traditional fresh cheese produced and widely commercialized in Brazil (Gomes, Franco, & De Martinis, 2013). MFC is classified as soft, semi-fat, unripened cheese with high water activity. It is produced by enzymatic coagulation of raw or pasteurized milk using rennet or coagulants, with or without starter cultures (Damaceno et al., 2015). Due to the high moisture content, pH levels above 5.0, low salt concentration, absence of defined starter cultures and excessive hand manipulation during manufacture, MFC is a favorable environment to the growth of contaminating microorganisms becoming highly perishable (Brito et al., 2008; Carvalho, Viotto, & Kuaye, 2007; Furtado, Todorov, Landgraf,

Destro, & Franco, 2015).

The microbiota of dairy products is highly diverse and with regards to the cheese microbiological quality, its characterization may provide knowledge about sanitary and food safety issues (Jonnala, Mcsweeney, Sheehan, & Cotter, 2018). However, besides the economic and cultural values of MFC, the associated microbial communities are still insufficiently characterized. Traditionally, microbiota of MFC has been studied through culture-based techniques. Most studies seek the occurrence of specific microorganisms included among the hygiene and safety regulatory microbial targets established for MFC, such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., coliforms and coagulase-positive staphylococci (Sant'Ana et al., 2013; Apolinário, Santos, & Lavorato, 2014; Brito et al., 2008). Culture-independent methods based on genetic fingerprinting techniques, such as PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), were also routinely applied to investigation of bacterial diversity in MFC, but these methods do not provide a

* Corresponding author. Laboratory of Physiology and Microbial Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: carol.lopesdp@gmail.com (A.C.L. de Paula), jdutramedeiros@gmail.com (J.D. Medeiros), gabriel.fernandes@cpqrr.fiocruz.br (G.R. Fernandes), vania.silva@icb.ufjf.br (V.L. da Silva), claudio.diniz@icb.ufjf.br (C.G. Diniz).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110791>

Received 24 September 2020; Received in revised form 10 December 2020; Accepted 17 December 2020

Available online 24 December 2020

0023-6438/© 2020 Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

comprehensive coverage of microbial populations (Arcuri, El Sheikh, Rychlik, Piro-métayer, & Montet, 2013; Paula et al., 2018; Perin et al., 2015; Perin, Savo Sardaro, Nero, Neviani, & Gatti, 2017). The development of High Throughput Sequencing (HTS) platforms has impacted the field of microbial ecology. The application of HTS has gained increasing attention due to its potential to provide new insights into microbial complexity of environments, including water, soil, human gut, as well as fermented foods (Ercolini, Filippis, Stora, & Iacono, 2012; Escobar-Zepeda, Sanches-Flores & Baruch, 2016; Gałazka et al., 2018; Losasso et al., 2018; Lusk et al., 2012; Planý et al., 2016; Quigley et al., 2012; Tan et al., 2015).

In an ecological perspective, considering the lack of sanitary regulations, the knowledge is rising on the role of MFC as reservoir of bacteria resistant to antimicrobial drugs as the resistance phenomena gain visibility worldwide in the One Health approach (Fontes et al., 2013; Paula et al., 2018). One Health approach are related to the integrative view and management considering human health, animal health, and environment, as well as adoption of effective public policies to prevent and control diseases which might include food safety, zoonosis, and antimicrobial-resistance control (Ogawa, Shah, Hughes, & King, 2019; Sanderson et al., 2019).

Considering economic and cultural relevance, and the lack of scientific knowledge on the entire MFC microbiota, the aim of this study was to understand the structure of microbial community in MFC, establishing the identity of dominant bacterial populations. In this study as a novelty, high throughput sequencing of 16S rRNA gene was used as methodological approach. Previously, the clinical resistome of MFC based on metagenomic DNA using the same cheese samples were investigated and highlighted the role of MFC in the antimicrobial resistance epidemiology as an important reservoir of antimicrobial-resistance related genetic markers and class-1 integrons (Paula et al., 2018).

2. Materials and methods

2.1. Sample processing and DNA extraction

Samples from 28 MFC from seven different commercially manufactured and trademarked brands (A, B, C, D, E, F, and G) were purchased in retail market in Juiz de Fora (Minas Gerais State, Brazil). All the cheeses were manufactured in the region of Zona da Mata from Minas Gerais State in Brazil. GPS locations for the manufacturing sites are given in Supplementary Material (Fig. S1). All brands have trade license and sanitary certification according to the Brazilian regulations. Following this regulation, the cheeses were made from pasteurized bovine milk. After acquisition, the samples were kept in an ice box and sent to the laboratory for immediate processing, as previously described (Paula et al., 2018). Briefly, 25-g cheese portions of each sample were weighed and homogenized in sterile sodium citrate buffer (225 mL of a 2% (w/v) solution, pH 7.5). Further, aliquots of 50 mL were centrifuged (14,000×g, 10 min), and the supernatant containing the fat layer was discarded. The pellet obtained was brought in solution with 10 mL of Tris-EDTA (TE) (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA, pH 8) and then centrifuged at 14,000×g for 10 min. This step was repeated twice, and the obtained pellet was resuspended in 200 µL of TE buffer. DNA was extracted from the cells pellet using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was accessed by fluorimetry using a Qubit 2.0 fluorometer, with the Qubit dsDNA HS Assay kit (Life Technologies, USA). DNA integrity was checked by 0.8% agarose gel electrophoresis. The resulting purified DNA was stored at -70 °C until use.

2.2. 16S rRNA amplicon library preparation and sequencing

Four samples of each cheese brand, which presented high similarity

in previous fingerprinting analysis to access the overall microbial community (Paula et al., 2018), were selected for metatransomic sequencing. The V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene were amplified using the primer pair 341F and 806R (Klindworth et al., 2013). The primers were modified to contain an overhang sequence (underlined highlighted) that were complementary to the Nextera XT Index (Illumina, USA) as follows: 341F (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 806R (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). The PCR reaction was performed in 25 µL of final volume containing, 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 2.5 µM of primer and 12.5 ng of DNA. Cycle conditions were 95 °C (3 min), then 25 cycles of 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s), and a final extension of 72 °C (5 min).

Libraries were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) according to the Illumina 16S metagenomic sequencing library protocol. The amplicons were ligated to an index sequence during a second PCR, containing 25 µL of 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 5 µL of each Nextera XT index, 5 µL of the PCR purified product and 10 µL of ultrapure water (50 µL final volume). Cycle conditions were 95 °C (3 min), then 8 cycles of 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s), with a final extension of 72 °C (5 min). Libraries were again purified using magnetic beads and the size of the libraries was checked by Bioanalyzer DNA 1000 Assay (Agilent, USA). Quantification was carried with KAPA Library Quantification Kit Illumina (Roche, Switzerland) and further DNA libraries were normalized and pooled. The libraries were paired-end sequenced (2 × 300) in a single run on Miseq platform (Illumina, USA). Sequencing was performed on the Next Generation Sequencing platform of the René Rachou Institute (CPqRR/FIOCRUZ-MG).

2.3. Data analysis

The 16S rRNA gene data was analyzed according to the pipeline recommended by Brazilian Microbiome Project, available at <http://bmicrobiome.org> (Pylro et al., 2014). Briefly, quality control of the sequence was realized with Trimmomatic v0.32 (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014), and the sequences were truncated to 100 bp size. The unique sequences (singletons) were removed. Sequence clustering was performed following the UPARSE method at 97% similarity cutoff (Edgar, 2013). Taxonomy was assigned with SILVA 132 (Quast et al., 2013) using the QIIME v. 1.9.1 (Caporaso et al., 2010).

Diversity estimative was carried out by QIIME package (Bolger et al., 2014). Rarefaction curves were constructed based on the operational taxonomic unit (OTU) richness as a function of sequencing depth, to evaluate the sequencing effort. For alpha diversity, the richness estimator Chao1, Shannon and Simpson indices were considered. Analysis of variance (ANOVA) were performed to indices values using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), followed by a Tukey test at 1% probability. For beta-diversity estimations, principal coordinates analysis (PCoA) were performed using the weighted UniFrac distance metrics.

The sequence data were submitted to the GenBank databases and are under accession nos. SAMN10721671, SAMN10721672, SAMN10721673, SAMN10721674, SAMN10721675, SAMN10721676, SAMN10721677, SAMN10721678, SAMN10721679, SAMN10721680, SAMN10721681, SAMN10721682, SAMN10721683, SAMN10721684, SAMN10721685, SAMN10721686, SAMN10721687, SAMN10721689, SAMN10721689, SAMN10721690, SAMN10721691, SAMN10721692, SAMN10721693, SAMN10721694, SAMN10721695, SAMN10721696, SAMN10721697, SAMN10721698.

3. Results

3.1. Sequencing output and diversity estimates

A total of 2,025,720 good-quality sequences from 16S rRNA gene

were obtained from 27 samples of MFC, corresponding to 181,220, 185,578, 188,554, 555,235, 368,456, 432,871 and 113,806 reads from brands A, B, C, D E, F and G respectively (Supplementary Table S1). As the sequence quality of one cheese sample from brand B failed to meet the expected good-quality sequences, it was excluded from the study. Rarefaction plot indicated that the overall sequencing effort was enough to active the bacterial biodiversity within MFC regardless all brands, since the curves obtained tend to reach an asymptote (Supplementary Fig. S2).

Species diversity (α -diversity) revealed high richness (Chao1) and a diverse microbiota (Shannon and Simpson index) (Supplementary Table S1). By comparing the different cheese brands, the brand C showed to harbor significantly lower species richness and diversity compared to others, in accordance to a lower equitability of microbial community observed for these cheeses samples (brand C) (Supplementary Table S1). The β -Diversity analysis resulted from weighted UniFrac PCoA suggests different microbial patterns between cheese samples, but a similar pattern within a brand leading to different microbial clusters according to the different MFC brands (Fig. 1). The microbiota patterns from brand B and C were grouped closely together inside the cluster if compared to the other brands.

Overall the samples were clearly brand-clustered. Considering the origin of the MFC samples, β -diversity evaluation might be highly related to the standardization along the production chain, and the sampling of this study was reproducible. This result is in agreement with the expected, since the products from the same batch are supposed to be processed under similar conditions.

3.2. Taxonomic profile of Minas Frescal Cheeses

The taxonomic distribution of Bacteria is shown in Fig. 2a at phylum level. Slight differences in the abundance of bacterial taxa were observed between the MFC brands. Phylogenetic assignment of sequencing data showed the occurrence of thirteen different bacteria

phyla. Proteobacteria was the most representative in all cheese samples, corresponding an average of 88.7% of all sequence reads. Firmicutes was the second most abundant bacteria phylum, comprising 8.4% of the all sequence reads, but with higher count in cheese samples belonging brands D and F (29–31% and 17–27% respectively). Bacteroidetes (2.5%) and less-dominant populations were also detected, but occasionally (represented in Fig. 2a as other phyla). Unassigned OTUs indicated on Fig. 2a represent OTUs that were not classified at the phyla level.

Considering genus level, differences between the cheeses become more evident. Fig. 2b shows the bacterial genus that contributed $\geq 1\%$ to the overall distribution in the brands. Around 10–31% of sequences from each brand analyzed, corresponded to unassigned OTUs, which were not classified at the genus level but were at the higher ones. The results showed that bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Vibrio* constituted the main groups presented in most of the samples and per brands.

At the genus level, members of Firmicutes phylum corresponded, almost exclusively, to *Enterococcus*. Detection frequencies of *Enterococcus* were higher in the brand D and F samples than in the other brands. In general, low abundance for lactic acid bacteria group was observed in all brands. Within this group (abundance $\geq 1\%$) *Enterococcus* was observed in brands A (1%), D (16%) and F (14%), whereas *Lactococcus* was observed in brands D (2%) and F (1%), and *Streptococcus* was observed in brand D (1%).

Considering the subdominant populations, the data retrieved showed a number of other notable groups. *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Marinomonas*, *Escherichia-Shigella*, *Moraxella*, *Chryseobacterium* and *Pseudomonas* were found among the tested cheese brands. It was noticeable, however, that samples belonging Brand C harbored a significantly different bacterial profile. This brand showed less diversity (Supplementary Table S1), dominated clearly by *Pseudomonas* (74% of the sequences), although other genera were present, including *Escherichia-Shigella*, *Moraxella*, *Azobacter* and *Stenotrophomonas*.

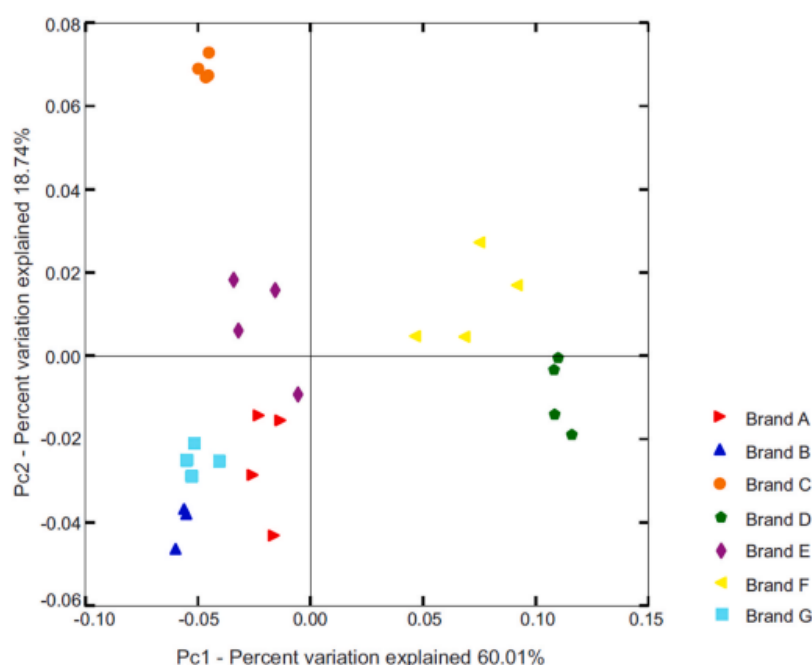


Fig. 1. Principal coordinate analysis (PCoA) of the bacterial communities of cheese samples, generated with Weighted UniFrac distance matrix. The colors refer to Brand A (red), Brand B (dark blue), Brand C (orange), Brand D (green), Brand E (purple), Brand F (yellow), Brand G (light blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

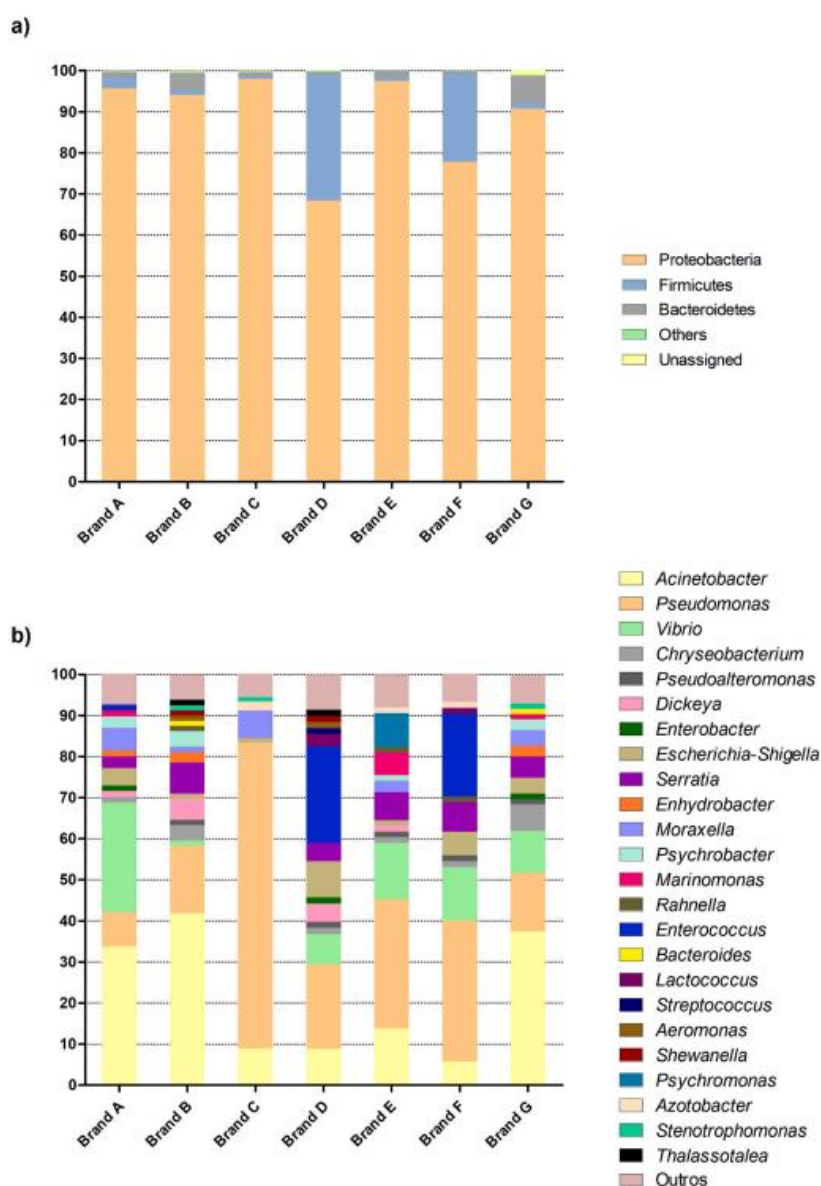


Fig. 2. Relative abundances of bacteria at the (a) phyla level (b) and genera level. Results are disclosed as an average of reads generated from individual samples cheese from each brand. Only phyla and genera with relative abundance greater than 1% were included. All OTUs with lower abundance were grouped as "other".

3.3. Microbiota core

In order to evidence the microbiota core of MFC, a more refined analysis was performed. One hundred ninety OTUs were present in all cheese samples and were considered as core members of the microbiota. Fig. 3a summarizes the 20 most abundant, and includes OTUs at family level (Enterobacteriaceae), genus level (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus* and *Moraxella*) and species level (*Serratia plymuthica* and *Dickeya chrysanthemi*).

Notably, members of the Enterobacteriaceae family dominated among the most abundant OTUs of the core microbiota, corresponding to 41% of the reads, followed by Pseudomonadaceae family, with 32% (Fig. 3b). The genera of Moraxellaceae family (*Acinetobacter* and *Moraxella*) and Enterococcaceae family (*Enterococcus*) corresponded to 14%

and 13% of the most abundant OTUs found in the core microbiota, respectively.

4. Discussion

The microbiota of cheese plays a key role in determining its organoleptic properties, nutrient composition, shelf-life and safety. Understanding the impact of this community on these aspects is crucial to increasing the quality of cheeses (Jonnala et al., 2018). In this study, the high throughput sequencing of 16S rRNA gene provided detailed insights into the microbiota of Minas Frescal Cheese, which presented several microbial groups not previously described for this specific cheese type.

As expected, all replicates within each cheese brand clustered well,

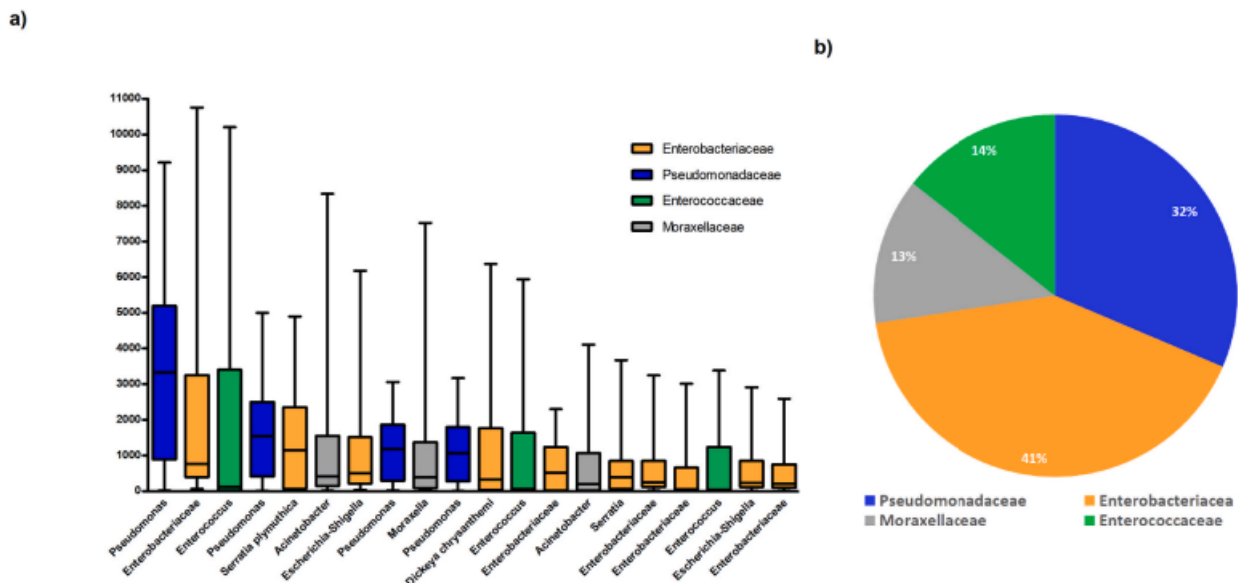


Fig. 3. (a) Box plots displaying the median, minimum, maximum, first and third quartiles of number of reads assigned to the 20 OTUs most abundant of the core microbiome detected in all cheese samples. (b) Relative abundances of the families corresponding to the 20 OTUs most abundant of the core microbiome. The colors refer to representatives of Enterobacter family (orange), Pseudomonadaceae family (blue), Enterococcaceae family (green) and Moraxellaceae family (gray). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

except for sample 23 in Brand E. This observation is in accordance with a study previously performed by our group (Paula et al., 2018), in which the same samples also clustered in a similar way using fingerprinting technique. The brand-clusterization of the samples is a good parameter to evaluate reproducibility in food production chain, during cheese manufacture, since the products from the same batch are processed under similar conditions, and therefore exposed to the same microbiological quality. In addition, as long as the five cheese brands used in this study were similar in style, color and texture, the bacterial taxonomic profiles of each brand, in turn, were different. It was already demonstrated for Latin-style cheeses also using next-generation sequencing, a contrasting microbial community among three soft cheeses samples belonging different brands (Lusk et al., 2012). These data may suggest that despite similarity of cheese type, raw materials and cheese making conditions seems to play an important and critical role in the microbial composition of the final product, thus contributing to the unique bacterial structure of each brand.

Regarding the taxonomic distribution of bacteria groups (Fig. 2), several studies have already reported prevalence of Firmicutes in different cheeses (Lusk et al., 2012; Planý et al., 2016; Riquelme et al., 2015; Escobar-zepeda, Sanchez-flores, & Baruch, 2016; Sullivan et al., 2015), unlike our study in which Proteobacteria was the most representative in all tested MFC samples, being *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. more frequently identified. The lower abundance of Firmicutes observed is in agreement with the low incidence of lactic acid bacteria (LAB), counting for subdominant population. It was previously observed that the level of cheese maturation has a significant influence on *Lactobacillus* populations (Quigley et al., 2012). In hard cheeses, *Lactobacillus* populations are increased compared to those in soft cheeses, what may suggests positive correlations between the level of cheese maturation and the development of lactic acid bacteria (Quigley et al., 2012). Add to that, lower incidence of LAB in ricotta, a fresh soft cheese that does not undergo fermentation or ripening, was previously associated with a higher relative abundance of contaminating bacteria from the surfaces and the related manufacturing plant (Stellato, De Filippis, La Stora, & Ercolini, 2015). Therefore, it is interesting to hypothesize that the establishment of LAB could have a valuable effect

toward protection against spoilage bacteria found in this study. Besides as long as most of the Firmicutes in this study are related to *Enterococcus* in all tested MFC samples from different commercial brands, it is reasonable to raise issues regarding widespread contamination which may result in sanitary risks to consumers, especially due emergence of antibiotic-resistant strains (Hammad, Hassan, & Shimamoto, 2015).

It has been demonstrated that non-pathogenic Gram-negative bacteria, especially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, naturally contaminate foods and their processing environment (Møretrø & Langsrud, 2017). These predominance and persistence is likely due to growth at low temperatures, ability to form biofilms, low growth requirements and metabolic versatility (Møretrø & Langsrud, 2017; Quintieri, Fanelli, & Caputo, 2019). With regards to refrigerated fresh dairy products, these bacterial groups were already reported by both culture-dependent and -independent approaches (Coton et al., 2012; Damaceno et al., 2015; Li et al., 2016; Stellato et al., 2015; Sullivan et al., 2015). By using 16S rRNA amplicon sequencing, other authors have reported that *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were the most abundant bacteria associated to core microbiota in a dairy processing plant, with a relative abundance above 50% (Stellato et al., 2015). *Pseudomonas* and *Acinetobacter* are recognized as major food spoilage microorganisms and undesirable in food processing environments (Arslan, Eyi, & Özdemir, 2011; Stellato et al., 2015). The production of heat-stable extracellular enzymes can be detrimental to the quality of cheese by causing bitter or rancid flavors and by impairing the coagulation properties of the milk. Furthermore, it is important to point out that some members of these bacterial groups are clinically and epidemiologically important bacteria and are under continuous selective pressure in hospital settings. *Vibrio* sp. were also detected as one of the most abundant bacteria in this study. Along with other subdominant populations such as *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Marinomonas* and *Pseudoalteromonas* which are considered halotolerant Proteobacteria, these microorganisms might generally reach MFC during brining, with salt acting as the source for contamination. These microbial groups were previously associated with soft, semihard and hard cheeses (Coton et al., 2012; Escobar-zepeda et al., 2016; Quigley et al., 2012; Riquelme et al., 2015; Stellato et al., 2015). However, the significance of their occurrence in the final product is not clear so far,

particularly at the high levels reported here as components of MFC microbiome. No negative health effects resulting from consumption of cheeses in association with these halotolerant bacteria have been reported, although *Psychrobacter* and *Aeromonas* can be involved in food spoilage.

The occurrence of *Escherichia-Shigella* in all brands is a concern. This microbial group comprises species which are potential human pathogens and may be highly associated to common post-pasteurization contaminant. Previously, these microorganisms had been reported as important contaminants in dairy products including milk and different cheese types, worldwide, including MFC in Brazil (Ahmed & Shimamoto, 2014; Araújo, Pagliares, Queiroz & Freitas-Ameida, 2002; Carvalho et al., 2014; Freitas, Brito, Nero, & Carvalho, 2013; García-Fulgueiras et al., 2001; Okura & Marin, 2014). The *Escherichia-Shigella* group was also related to raw milk and food handlers in a dairy processing plant (Campos et al., 2009).

The use of raw or pasteurized milk is assumed to affect the microbiota of cheeses. It was already observed differences between microbial communities from raw compared to pasteurized milk cheeses, suggesting higher bacteria diversity in cheese made out of raw milk (Deltens-erie et al., 2014). The thermal processing in dairy production chain is preconized as microbiological safety to avoid endogenous contamination of foodstuff with potentially pathogenic bacteria and to reduce the bacterial burden (Lado & Yousef, 2002). To ensure safe pasteurized milk on the other hand, is important a proper pasteurization and prevention of post-pasteurization contamination (Sarkar, 2015). Our data may suggest that although considering the use of pasteurized milk, the production chain of MFC becomes vulnerable to post-pasteurization contamination with environmental potentially pathogenic bacteria. These observations were, however, not restricted to just one cheese brand, but also to all evaluated brands which were purchase in several retail food stores.

Some studies focusing on cheese microbiota using HTS, defined a common core microbiome from cheese-making units within the same broad geographic area (Filippis, Parente, & Ercolini, 2017; Filippis, Tora, Stellato Gatti, & Ercolini, 2014; Quigley et al., 2012). Here we also investigated the core microbiome of MFC. A predominance of the Enterobacteriaceae family among the common OTUs in this study may be related to the values of pH, water activity, and NaCl concentrations. According to the literature the presence of Enterobacteriaceae in dairy products generally indicates direct or indirect fecal contamination of the milk or the product during manufacture process and thus, have been linked to poor hygiene conditions (Coton et al., 2012; Haddad & Yamani, 2017; Mørseth & Langsrud, 2017). This bacterial group is also recognized as spoilage organisms in many types of food. Lipolytic and proteolytic enzymes produced by some Enterobacteriaceae can adversely affect organoleptic features of cheese and gas-producing strains have been related to texture and flavour defects (Tabla et al., 2016).

In addition, these bacteria are highly relate to the antimicrobial resistance phenomenon and may become available through food consumption, figuring an additional risk factor to consumers (Verraes et al., 2013). Based on a direct analysis of total DNA, De Paula and collaborators (2018) previously detected several resistance genes from the same cheese samples used in this study (Paula et al., 2018). The genotypic characterization by PCR assays revealed that one of the major genes responsible for extended spectrum lactamases (ESBL) production, *bla-TEM* gene, was detected in 91.4% of the samples. This gene is strongly associated with Enterobacteriaceae species and is mainly encoded by plasmids and mobile genetic elements such as integrons, insertion sequences, transposons and plasmids (Tekiner & Özpinar, 2016). These results highlight the potential contribution of the main group in the MCF core microbiome to human health risks by dissemination of ESBLs genes. Others studies showed that ESBL-producing Enterobacteriaceae strains and their mobile genetic elements can be transmitted to humans, especially through meat, milk, and other foods of animal origin (Gaffer,

Gwida, Samra, & Ashmawy, 2019; Husan & Çadirci, 2019; Tekiner & Özpinar, 2016).

Pseudomonas spp., widely studied for food spoilage effects, are instead underestimated for their possible impact on human health. Fresh dairy products can be considered a reservoir of *Pseudomonas* spp. resistome, potentially transmittable to consumers (Arslan et al., 2011; Quintieri et al., 2019). In *P. aeruginosa*, the multidrug resistance phenotype is largely conferred by efflux systems coded by *mex* genes, contributing to the intrinsic resistance in this specie (Kievit et al., 2001; Rocha et al., 2019). The clinical resistome of MFC investigated by De Paula and collaborators (2018) also revealed the presence of *mex* genes in 30–50% of the samples (Paula et al., 2018).

Many factors favor the spread of antibiotic resistance and the food chain play a crucial role, connecting environmental, animal and human habitats for pathogenic, opportunistic, and spoilage bacteria, which can carry resistance genes (Bengtsson-Palme, 2017). The human population may be exposed indirectly to antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes via contact with or consumption of contaminated food products (Founou, Founou, & Essack, 2016; Lammie & Hughes, 2016). In cheeses with high moisture content, such as Minas cheese, some spoilage bacteria found in this study are not included among the hygiene and safety regulatory microbial targets (Visotto, Oliveira, Prado, & Bergamini, 2011). Therefore, the occurrence of resistant foodborne bacteria within this specific group, generally ingested alive through refrigerated fresh dairy products, raise possible risks for human health and poses a number of issues which are overlooked.

5. Conclusion

This study presents a first look at the microbial composition of MFC using High Throughput Sequencing. We highlighted the high abundance of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* in cheese brands and low incidence of lactic acid bacteria, as well as a core microbiome with predominance of Enterobacteriaceae family. In general, these information may be crucial in formulate strategies to optimize the quality and safety, extend shelf-life and reinforce commercial value of Minas Frescal Cheese, as well as to preserve a traditional food that supports the economy of local producers.

Although here sequencing has not been applied to food safety assessment of resistant bacteria, it was demonstrated in recent study that the same samples of MFC also act as a reservoir of genes coding for antibiotic resistance. These findings suggest an additional risk for consumers, since the bacterial groups found in the Minas Cheese microbiome, including spoilage, can act as hosts for these genes and provide a likely route for the entry of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes into the community and healthcare environments. The role of food chain in the dissemination of antimicrobial resistance highlight the importance of an integrated and holistic multisectoral One Health approach in struggle this major public health issue.

6. Credit author statement

Ana Caroline Lopes de Paula: Conducting a research and investigation process, specifically performing the experiments, or data/evidence collection; Preparation, creation and/or presentation of the published work, specifically writing the initial draft (including substantive translation). Julliane Dutra Medeiros: Management activities to annotate (produce metadata), scrub data and maintain research data (including software code, where it is necessary for interpreting the data itself) for initial use and later reuse; Application of statistical, mathematical, computational, or other formal techniques to analyze or synthesize study data. Gabriel da Rocha Fernandes: Management activities to annotate (produce metadata), scrub data and maintain research data (including software code, where it is necessary for interpreting the data itself) for initial use and later reuse. Vânia Lúcia da Silva: Provision of study materials, reagents, materials, laboratory samples,

instrumentation, computing resources, or other analysis tools; Preparation, creation and/or presentation of the published work, specifically writing the initial draft (including substantive translation). Cláudio Galuppo Diniz: Oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution, including mentorship external to the core team; Management and coordination responsibility for the research activity planning and execution; Provision of study materials, reagents, materials, laboratory samples, instrumentation, computing resources, or other analysis tools; Preparation, creation and/or presentation of the published work by those from the original research group, specifically critical review, commentary or revision – including pre-or post-publication stages; Acquisition of the financial support for the project leading to this publication.

Declaration of competing interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Pos-Graduate Program in Biological Sciences (PPGC BIO/UFJF) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and next-generation sequencing and bioinformatics platforms of the Instituto René Rachou (FIOCRUZ-Minas).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110791>.

References

- Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2014). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 168(169), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.014>
- Apolinário, T. C. C., Santos, G. S., & Lavorato, J. A. A. (2014). Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas frescal produzido por laticínios do Estado de Minas Gerais. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 69(6), 433. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i6.290>
- Araújo, V. S., Pagliari, V. A., Queiroz, M. L., & Freitas-Almeida, A. C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1172–1177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01656.x>
- Arcuri, E. F., El Sheikh, A. F., Rychlik, T., Piro-métayer, L., & Montet, D. (2013). Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR e DGGE : Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*, 30, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.007>
- Arsan, S., Eyi, A., & Özdemir, F. (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5851–5856. <https://doi.org/10.3168/jds.2011.4676>
- Bengtsson-Palme, J. (2017). Antibiotic resistance in the food supply chain: Where can sequencing and metagenomics aid risk assessment? *Current Opinion in Food Science*, 14, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.010>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Brito, J. R. F., Santos, E. M. P., Arcuri, E. F., Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Souza, G. N., et al. (2008). Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4954–4961. <https://doi.org/10.1128/AEM.01828-07>
- Campos, M. R. H., André, M. C. D. P. B., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., & Serafini, A. B. (2009). Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(5), 1203–1209. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000500025>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Carvalho, R. N., de Oliveira, A. N., de Mesquita, A. J., Rezende, C. S. M., de Mesquita, A. Q., & Romero, R. A. M. (2014). PCR and ELISA (VIDAS ECO O157®) *Escherichia coli* O157:H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiânia, GO. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 7–10. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100002>
- Carvalho, J. D. G., Viotto, W. H., & Kuaye, A. Y. (2007). The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, 18(3), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.005>
- Coton, M., Delbès-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., et al. (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiology*, 29(1), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.020>
- Damaceno, H. F. B., de Freitas Junior, C. V., Marinho, I. L., Cupertino, T. R., Costa, L. E. de O., & Nascimento, J. dos S. (2015). Antibiotic resistance versus antimicrobial substances production by gram-negative foodborne pathogens isolated from Minas frescal cheese: Heads or tails? *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(4), 297–301. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1876>
- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhall, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., et al. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6046–6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225>
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE : Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>, 10, 996–998.
- Ercolini, D., Filippis, F. De, Stora, L., & Iacono, M. (2012). “remake” by high-throughput sequencing of the microbiota. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-12>, 78, 22, 8142–8145.
- Escobar-zepeda, A., Sanchez-flores, A., & Baruch, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>
- Filippis, F. De, Parente, E., & Ercolini, D. (2017). Minireview Metagenomics insights into food fermentations. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12421>, 10, 91–102.
- Filippis, F. De, Stora, A. La, Stellato, G., Gatti, M., & Ercolini, D. (2014). A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089680>, 9, 2.
- Fontes, C. O., Silva, V. L., de Paiva, M. R. B., Garcia, R. A., Resende, J. A., Ferreira-Machado, A. B., et al. (2013). Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA*-encoding coagulase-negative staphylococci isolated from soft cheese in Brazil. *Journal of Food Science*, 78(4), 594–599. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12088>
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Freitas, R., Brito, M. A., Nero, L. A., & Carvalho, A. F. (2013). Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. *Foodborne Pathogens & Disease*, 10(11), 951–955. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1525>
- Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. M. (2015). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04MI isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. *Brazilian Journal of Microbiology: (Publication of the Brazilian Society for Microbiology)*, 46(1), 201–206. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130761>
- Gaffer, W., Gwida, M., Samra, R. A., & Ashmawy, M. A. (2019). Occurrence and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae in milk and some dairy products. *Slovenian Veterinary Research*, 56, 475–485. <https://doi.org/10.26873/SVR-785-2019>
- García-Fulgueiras, A., Sánchez, S., Guillén, J. J., Marsilla, B., Aladueña, A., & Navarro, C. (2001). A large outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis associated with consumption of fresh pasteurised milk cheese. *European Journal of Epidemiology*, 17(6), 533–538. <https://doi.org/10.1023/A:1014504305666>
- Galazka, A., Grządziel, J., Galazka, R., Ukalska-Jaruga, A., Strzelecka, J., & Smreczak, B. (2018). Genetic and functional diversity of bacterial microbiome in soils with long term impacts of petroleum hydrocarbons. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01923>
- Gomes, B. C., Franco, B. D. G. de M., & De Martinis, E. C. P. (2013). Microbiological food safety issues in Brazil: Bacterial pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 197–205. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1222>
- Haddad, M. A., & Yamani, M. I. (2017). Microbiological quality of soft white cheese produced traditionally in Jordan. *Journal Food Processing Technology*, 8(12), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000706>
- Hammad, A. M., Hassan, H. A., & Shimamoto, T. (2015). Prevalence , antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, 50, 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.020>
- Husan, O., & Çadır, Ö. (2019). Determination of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae from cheese samples sold in public bazaars. *Journal of Food Safety*, 39. <https://doi.org/10.1111/jfs.12680>
- Jonnala, B. R. Y., Mcsweney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Kievit, T. De, Parkins, M., Gillis, R., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., et al. (2001). Multidrug efflux Pumps : Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1761–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1761>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-

- generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4(4), 433–440. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01557-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01557-5)
- Lammie, S. L., & Hughes, J. M. (2016). Antimicrobial resistance, food safety, and one health: The need for convergence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 287–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033251>
- Li, L., Renye, J. A., Feng, L., Zeng, Q., Tang, Y., Huang, L., et al. (2016). Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7016–7024. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11041>
- Losasso, C., Eckert, E. M., Mastroianni, E., Villiger, J., Barrucci, F., Pemthaler, J., et al. (2018). Assessing the influence of vegan, vegetarian and omnivore oriented westernized dietary styles on human gut Microbiota: A cross sectional study. *Frontiers in Microbiology*, 9, 317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00317>
- Lusk, T. S., Ottesen, A. R., White, J. R., Allard, M. W., Brown, E. W., & Kase, J. A. (2012). Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiology*, 12(1), 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-254>
- Møretro, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Ogawa, V. A., Shah, C. M., Hughes, J. M., & King, L. J. (2019). Prioritizing a one health approach in the immediate fight against antimicrobial resistance. *EcoHealth*, 16(3), 410–413. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1325-6>
- Okura, M. H., & Marin, J. M. (2014). Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. *Ciência Rural*, 44(8), 1506–1511. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131237>
- Paula, A. C. L. De, Medeiros, J. D., Azevedo, A. C. De, Chagas, M. D. A., Silva, L., & Diniz, G. (2018). Antibiotic resistance genetic markers and integrons in white soft Cheese: Aspects of clinical resistance and potential of horizontal gene transfer. *Genes*, 9, 106. <https://doi.org/10.3390/genes9020106>
- Perin, L. M., Dal Bello, B., Belviso, S., Zeppa, G., de Carvalho, A. F., Coccolin, L., et al. (2015). Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006>
- Perin, L. M., Savo Sardaro, M. L., Nero, L. A., Neviani, E., & Gatti, M. (2017). Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiology*, 65, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>
- Planý, M., Kuchta, T., Šoltýs, K., Szemes, T., Pangallo, D., & Siekel, P. (2016b). Metagenomic analysis of Slovak bryndza cheese using next-generation 16S rDNA amplicon sequencing. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(1), 23–34. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0003>
- Pylro, V. S., Roesch, L. F. W., Ortega, J. M., do Amaral, A. M., Tótola, M. R., Hirsch, P. R., et al. (2014). Brazilian microbiome project: Revealing the unexplored microbial diversity-challenges and prospects. *Microbial Ecology*, 67(2), 237–241. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0302-4>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Glo, F. O., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quigley, L., Sullivan, O. O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5717–5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- Quintieri, L., Fanelli, F., & Caputo, L. (2019). Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. Spoilers in fresh dairy Products: An underestimated risk and the control strategies. *Food*, 8, 372. <https://doi.org/10.3390/foods8090372>
- Riquelme, C., Cámara, S., Enes Dapkevicius, M. de L. N., Vinuesa, P., da Silva, C. C. G., Malcata, F. X., et al. (2015). Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*, 192, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.031>
- Rocha, A. J., Barsottini, M. R. O., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., De Moraes, F. L. L., & Da Rocha, S. L. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence factors and antibiotic resistance genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, 1–15. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503>
- Sanderson, H., Brown, R. S., Hania, P., McAllister, T. A., Majury, A., & Liss, S. N. (2019). Antimicrobial resistant genes and organisms as environmental contaminants of emerging concern: Addressing global public health risks. In B. Roig, K. Weiss, & V. Thireau (Eds.), *Management of emerging public health issues and risks* (pp. 147–187). London: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813290-6.00007-x>
- Sant'Ana, A. M. S. S., Bezerra, F. F., Madruga, M. S., Batista, A. S. M., Magnani, M., & Souza, E. L. (2013). Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7442–7453. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6915>
- Sarkar, S. (2015). Microbiological considerations: Pasteurized milk. *International Journal of Dairy Science*, 10, 206–218. <https://doi.org/10.3923/ijds.2015.206.218>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Sullivan, D. J. O., Cotter, P. D., Sullivan, O. O., Gblin, L., McSweeney, P. L. H., & Sheehan, J. (2015). Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 2525–2533. <https://doi.org/10.1128/AEM.04054-14>
- Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., & Roa, I. (2016). Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw Ewe's milk cheese: Gas production capacity. *Small Ruminant Research*, 145, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.008>
- Tan, B. F., Ng, C., Nshimiyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y. H., & Thompson, J. R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: Current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>
- Tekiner, I. H., & Özpınar. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., et al. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Visotto, R. G., Oliveira, M. A., Prado, S. P. T., & Bergamini, A. M. M. (2011). Queijo Minas frescal: Perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70(1), 8–15.