

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Programa de Pós-Graduação em Saúde  
Doutorado em Saúde

**Cláudia Oliveira Fontes**

***Staphylococcus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL: OCORRÊNCIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ASPECTOS DA VIRULÊNCIA**

Juiz de Fora  
2013

**CLÁUDIA OLIVEIRA FONTES**

***Staphylococcus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL: OCORRÊNCIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ASPECTOS DA VIRULÊNCIA**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Lúcia da Silva**

Juiz de Fora

2013

**Cláudia Oliveira Fontes**

***Staphylococcus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL: OCORRÊNCIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E ASPECTOS DA VIRULÊNCIA**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em: 12/04/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Aline Dias Paiva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Maria Emília de Oliveira  
Faculdade de Medicina do Vale do Aço

---

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos  
Universidade Federal de Minas Gerais

*Aos meus queridos pais, Nilton e Zélia, meu  
irmão Flávio e Tia Emília pelo incentivo e apoio  
incondicionais em todas as etapas da minha  
formação.*

*Ao meu afilhadinho lindo Murilo, a quem eu  
desejo um futuro brilhante.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que concluo mais esta etapa em minha formação acadêmica. No entanto, também é importante lembrar que esta conquista não se concretizou apenas com o meu esforço, mas sim como o reflexo da união de uma equipe de pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente na execução de todos os trabalhos...

Ao meu orientador e amigo **Cláudio Galuppo Diniz** e minha co-orientadora e amiga **Vânia Lúcia da Silva**, por terem me dado a grande oportunidade de realizar este trabalho. Acho que nunca disse isso com todas as letras, mas vocês dois fazem parte do grupo de pessoas mais importantes da minha formação. Não só abriram as portas do laboratório e confiaram em meu trabalho, mas principalmente me conduziram para um caminho que há muito tempo eu havia desanimado... "o Doutorado". Talvez eu nunca possa retribuir a altura, mas saibam que serei sempre grata ao casal!!

À querida **Carolina Fernandes**, uma verdadeira amiga para todas as horas... Um grande e belo exemplo de maturidade, dedicação, comprometimento, carisma e alegria. Sua companhia foi muito importante durante todos esses anos. Agradeço por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver com você, **Anderson** e a queridona vovó **Janete**, e que venham muitos e muitos anos de amizade pela frente!!

À velha (sem reclamar!) amiga **Gizele Garcia**, pelos 20 anos de amizade, pelo apoio na fase inicial do projeto e por ser uma amiga verdadeira, daquelas que são para sempre!!

Ao **Thiago Nascimento**, grande amigo e presidente de um clube famoso na mesa redonda (aquele que o Daibert fundou!!). Thiagón, obrigada por sua amizade durante todos esses anos e pelo exemplo de dedicação em tudo que você faz!!

Às queridas **Luziãx** e **Betânia**, por terem sempre uma palavra de incentivo, pelos conselhos e por serem grandes amigas. A amizade de vocês é muito importante!!

Aos amigos de Doutorado, especialmente aos queridos **Carolina, Juliana, Márcio, Michele, Thiago, Vanessa e Rô** pela convivência tão alegre, pelos almoços

no departamento, pelas saídas, pelas cervejinhas, pelo companheirismo e pela amizade. Vocês moram todos no meu coração!!

Aos amigos mestrandos e mestres do Lab, **Laura, Dani, Felipe, Mariana e Naiana** pela ótima convivência, pelas conversas, desabafos e pela amizade de vcs!!!

Aos professores da Microbiologia/ICB/UFJF: **Cláudio, Vânia, Luzia, Betânia, Márcio e Rô**, e à querida **Angélica** e ao **Leandro** por terem me recebido de braços abertos... Sempre me senti em casa na Microbiologia da UFJF. Obrigada pelas conversas, conselhos e principalmente pela amizade de vocês!!!

Aos professores substitutos e fiéis companheiros da mesa redonda: **Gizele Duarte, Carolina Fernandes, Fred Daibert, Thais Gama, Thiago Nascimento e Ivna Melo**, não só pela amizade, mas por deixarem nosso trabalho mais leve e prazeroso!!! Como tenho saudades da mesa redonda e das maldades de Daibert Veider!!!

Às companheiras de mesa redonda **Alessandra e Aline**, que chegaram quando eu não era mais substituta, mas se tornaram grande amigas.

Às minhas queridas e fundamentais ICs: **Rafaela Alvim, Mayara Brandão e Marina Fajardo**, sem a ajuda de vocês esse trabalho não estaria nem na metade. Vocês três foram minha mão direita e esquerda!!!

A **todos os ICs do lab**, que trabalharam direta ou indiretamente na realização do meu projeto, especialmente Pedro, Suzane, Natália e Tamara.

A **todos os professores** do DPMI/ICB.

Aos amigos de DPMI **Jacy, Alice e Gilson** pela prazerosa convivência, pelas saídas tão divertidas e pela amizade.

Aos **professores do curso de Doutorado em Saúde**, da Faculdade de Medicina da UFJF.

À **Cristina** e ao **Carlos** pela paciência e atenção na secretaria durante todo o curso.

À **Darcília**, pelo auxílio, gentileza e atenção durante todo o Doutorado.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A **todos** que de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para realização deste estudo, em especial às **famílias Oliveira e Fontes**,

A **Deus**, por todos vocês!!!

## RESUMO

Neste estudo, os padrões de susceptibilidade a antimicrobianos, ocorrência de marcadores moleculares de resistência aos antimicrobianos e biocidas, bem como as características de virulência associadas aos *Staphylococcus* spp., foram avaliados tanto em SCN quanto em *S. aureus* isolados de queijo Minas Frescal no Brasil. Um total de 246 isolados bacterianos foram recuperados de 35 amostras de queijo, as quais foram obtidas em cinco lotes de cada uma das sete marcas comerciais diferentes avaliadas neste estudo. As contagens bacterianas variaram de  $10^3$  a  $10^7$  UFC/g de queijo. Os percentuais elevados de resistência a antimicrobianos foram observados nos dois grupos bacterianos com relação à oxacilina, penicilina e eritromicina. Um percentual baixo de resistência aos antimicrobianos foi encontrado com relação ao cloranfenicol, e todas as bactérias avaliadas se mostraram susceptíveis à vancomicina e linezolida. No total, o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (MAR) > 0,2 foi observado em 80,6 % e 84,2 % dos isolados de SCN e *S. aureus*, respectivamente. Entretanto, o índice MAR variou de 50 % a 100 % considerando apenas os isolados bacterianos estudados por marca comercial de queijo. Com relação à prevalência de SCN e *S. aureus* que carregam o gene *mecA*, respectivamente, 81,5 % e 47,4 % das linhagens isoladas foram consideradas *mecA*<sup>+</sup>, e 76,2 % e 42,1 % destas se mostraram fenotipicamente resistentes à oxacilina. Três isolados bacterianos carregavam o gene para produção de enterotoxina A (*sea*), 30,5 % produziram biofilme em um teste de laboratório, e a  $\alpha$  ou  $\beta$ -hemólise foi observada em 2,8 % e 7,2 %, respectivamente, em todos os *Staphylococcus* spp. avaliados. Os marcadores moleculares de resistência aos antimicrobianos e biocidas mais prevalentes encontrados nas linhagens de SCN e *S. aureus* foram *blaZ*, *mecA*, *msrA*, *msrB*, *linA*, *aacA-aphD*, e *smr*. Este estudo destaca a importância do fenômeno da resistência aos antimicrobianos com relação aos microrganismos negligenciados que são veiculados por alimentos, e os prováveis riscos para a saúde pública relacionados ao consumo de queijo contendo bactérias do gênero *Staphylococcus*.

**Palavras chaves:** Queijo Minas Frescal, agentes antimicrobianos, resistência bacteriana, segurança alimentar, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativo.

## ABSTRACT

In this study, antimicrobial susceptibility patterns, molecular markers of antimicrobial and biocide-resistance occurrence and virulence-associated characteristics were evaluated in CoNS and *S. aureus* isolated from soft cheese in Brazil. A total of 246 bacterial isolates were recovered from 35 cheese samples belonging to five batches with seven different trademarks. The bacterial counts ranged from  $10^3$  to  $10^7$  CFU g<sup>-1</sup>. High antimicrobial resistance percentages were observed for oxacillin, penicillin and erythromycin for both *S. aureus* and SCN. A low antimicrobial resistance percentage was observed for chloramphenicol, and all of the tested bacteria were susceptible to vancomycin and linezolid. In total, a multiple antibiotic resistance (MAR) index of > 0.2 was observed for 80.6 % and 84.2 % of the isolated CoNS and *S. aureus*, respectively. However, the MAR index ranged from 50 % to 100 % when only bacterial cheese isolates belonging to the same trademark were considered. Regarding to the prevalence of SCN and *S. aureus* carrying *mecA* gene, respectively, 81.5 % e 47,4 % of the isolated strains were *mecA*<sup>+</sup>, and 76.2 % and 42.1 % of these were phenotypically resistant to oxacillin. Three isolates carried the *enterotoxin A* gene (*sea*), 30.5 % produced biofilm in a laboratory test, and  $\alpha$ - or  $\beta$ -hemolysis was observed for 2,8 % and 7.2 %, respectively, for all the *Staphylococcus* spp.. *blaZ*, *mecA*, *msrA*, *msrB*, *linA*, *aacA-aphD*, and *smr* were most prevalent molecular markers found both in SCN and *S. aureus* strains. This study highlights the extent of the antimicrobial resistance phenomenon in neglected foodborne microorganisms and the potential public health risks that are related to the consumption of *Staphylococci*-contaminated soft cheese.

**Keywords:** Minas soft cheese, antimicrobial agents, bacterial resistance, food safety, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negative.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1. Média da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo (log de UFC/g) por marca comercial de queijo. Cinco lotes diferentes foram avaliados representativamente a partir de cada marca comercial de queijo (A-G). A linha pontilhada representa a contagem máxima de *Staphylococcus aureus* permitida, de acordo com a legislação sanitária brasileira, para consumo seguro do alimento (Brasil 2001). 43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizadas na caracterização bacteriana.	36
<b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizada na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas.	38
<b>Tabela 3.</b> Contagem média de <i>S. aureus</i> (UFC/g) recuperadas das 35 amostras de queijo avaliadas, considerando as 7 marcas diferentes de QMF estudadas.	42
<b>Tabela 4.</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos com relação aos 227 isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo obtidos de 35 amostras de queijo Minas Frescal, representado por amostras sensíveis (S), com resistência intermediária (RI) e resistentes (R).	45
<b>Tabela 5.</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos com relação aos 19 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos de 35 amostras de queijo Minas Frescal, representado por amostras sensíveis (S), com resistência intermediária (RI) e resistentes (R)	46
<b>Tabela 6.</b> Detecção e distribuição dos determinantes genéticos relacionados à resistência aos antimicrobianos e biocidas entre as amostras de <i>Staphylococcus</i> isoladas das 7 marcas de queijo Minas Frescal.	48
<b>Tabela 7.</b> Correlação entre o perfil de susceptibilidade e a presença dos respectivos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos das 227 linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo isoladas a partir das 7 marcas comerciais diferentes de queijo Minas Frescal (no total de 35 amostras de queijo), considerando-se os genes de resistência aos antimicrobianos avaliados.	51
<b>Tabela 8.</b> Correlação entre o perfil de susceptibilidade e a presença dos respectivos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos das 19 linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas a partir das 7 marcas comerciais diferentes de queijo Minas Frescal (no total de 35 amostras de queijo), considerando-se os genes de resistência aos antimicrobianos avaliados.	52
<b>Tabela 9A.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 36 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal A.	54
<b>Tabela 9B.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 48 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal B.	55
<b>Tabela 9C.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 27 isolados bacterianos	

recuperados da marca de queijo Minas Frescal C.	57
<b>Tabela 9D.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 35 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal D.	58
<b>Tabela 9E.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 25 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal E.	59
<b>Tabela 9F.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 26 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal F.	60
<b>Tabela 9G.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, considerando os 30 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal G.	61
<b>Tabela 10.</b> Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as 19 linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> recuperadas das 35 amostras de queijo Minas Frescal avaliadas.	62
<b>Tabela 11.</b> Associação entre as características fisiológicas e moleculares de resistência à oxacilina, multirresistência, biofilme e atividade hemolítica entre as amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo recuperadas a partir das amostras de queijo Minas Frescal.	64
<b>Tabela 12.</b> Associação entre as características fisiológicas e moleculares de resistência à oxacilina, multirresistência, biofilme e atividade hemolítica entre as amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> recuperadas a partir das amostras de queijo Minas Frescal.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AZI:** Azitromicina

**BHI:** Infusão de cérebro e coração de boi (Brain heart infusion)

**CLI:** Clindamicina

**CLO:** Cloranfenicol

**CLSI:** Clinical Laboratory Standards Institute

**ERY:** Eritromicina

**GEN:** Gentamicina

**LEVO:** Levofloxacina

**LIN:** Linezolida

**MAR:** Multirresistência aos antimicrobianos

**MRSA:** *Staphylococcus aureus*

**MRSCNS:** *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina

**OXA:** Oxacilina

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PEN:** Penicilina

**QMF:** Queijo Minas Frescal

**RIF:** Rifampicina

**SCCmec:** Staphylococcal cassette chromosome mec

**SCN:** *Staphylococcus* coagulase negativo

**SIF:** Serviço de Inspeção Federal

**STX;** Sulfametoxazol-trimetoprim

**TE:** Tris-EDTA

**TET:** Tetraciclina

**TSA:** Tryptic Soy Agar

**TSB:** Tryptic Soy Broth

**UFC:** Unidade formadora de colônia

**VAN:** Vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
<b>2.1. Qualidade do leite</b>	15
<b>2.2. Queijo Minas Frescal</b>	16
2.1.1. Fatores de risco associados à contaminação do queijo Minas Frescal	17
2.1.2. Principais microrganismos contaminantes	18
<b>2.2. O gênero <i>Staphylococcus</i></b>	19
2.2.1. Principais características de virulência associadas às bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i>	21
<b>2.3. Fenômeno da resistência a antimicrobianos</b>	23
2.3.1. História e aspectos gerais da antibioticoterapia	23
2.3.2. Antimicrobianos e o gênero <i>Staphylococcus</i>	24
<b>3. OBJETIVOS</b>	30
<b>3.1. Objetivo Geral</b>	30
<b>3.2. Objetivos Específicos</b>	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
<b>5. RESULTADOS</b>	41
<b>6. DISCUSSÃO</b>	66
<b>7. CONCLUSÕES</b>	78
<b>REFERÊNCIAS</b>	79
<b>APÊNDICES</b>	93
<b>ANEXOS</b>	103

## 1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados fornecem aos seres humanos macro e micronutrientes por possuírem um balanço nutricional adequado, o que é indispensável ao crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. O Brasil destaca-se como grande consumidor e produtor de laticínios e, embora uma grande parte desses produtos esteja adequada tecnologicamente, ainda persistem problemas na produção do leite, que diminuem a qualidade da matéria prima, tornando-o inadequado para consumo *in natura*.

A higiene e o controle de qualidade dos produtos lácteos têm como função primordial assegurar a inocuidade. A presença de níveis elevados de determinadas bactérias e suas toxinas resultam em problemas sanitários, refletindo em grandes perdas econômicas. Neste contexto, a qualidade da matéria prima e o rigor na manipulação tornam-se importantes para o desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil.

O interesse quanto a segurança alimentar vem aumentando consideravelmente, uma vez que é crescente o número e a gravidade das doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Assim, considerando o queijo Minas Frescal um alimento básico na dieta humana, sua qualidade é essencial. Este tipo de queijo é produzido a partir da coagulação do leite, pela ação do coalho e/ou bactérias lácticas existentes ou adicionadas no leite. Trata-se de um produto de fabricação simples, de rápida comercialização e é amplamente consumido.

Pesquisas microbiológicas realizadas com queijo Minas Frescal têm demonstrado a ocorrência de patógenos putativos de relevância em saúde pública, destacando-se bactérias do gênero *Staphylococcus*.

O gênero *Staphylococcus* é constituído por bactérias que, além de colonizarem alguns sítios anatômicos de seres humanos e outros animais, estão também associados a várias doenças de natureza infecciosa e não-infecciosa, como intoxicações alimentares. Além disso, tais microrganismos apresentam grande variabilidade nos padrões de susceptibilidade a antimicrobianos. Os determinantes genéticos de resistência a drogas podem ser mediados genes cromossômicos

quanto por genes localizados em plasmídeos e podem ser disseminados por transferência horizontal.

Assim, considerando-se as cadeias produtivas do queijo Minas Frescal, os reservatórios bióticos (seres humanos e outros animais) e abióticos (utensílios e maquinário) de patógenos putativos e o fenômeno da resistência bacteriana às drogas, foi proposto o presente estudo, inserido na linha de pesquisa “Identificação e caracterização genética de microrganismos de importância humana e animal”, em desenvolvimento no Núcleo de Pesquisas em Doenças Infecto-parasitárias do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF. Pretende-se contribuir com dados científicos sobre a ocorrência, veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos e a distribuição de marcadores genéticos de resistência bacteriana a drogas, como determinantes da qualidade microbiológica desse produto e a circulação de *Staphylococcus* na região de Juiz de Fora.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Qualidade do leite**

O leite é um produto que pode ser considerado, sob a ótica dos aspectos biológicos, como um dos alimentos mais completos e de alto valor nutritivo, apresentando teor elevado de proteínas e sais minerais. É consumido amplamente pelos seres humanos em todas as faixas etárias e representa um dos principais alimentos inseridos na dieta infantil. Contudo, o leite e também seus derivados são considerados excelentes meios de cultivo microbiano, uma vez que apresentam uma grande variedade de nutrientes disponíveis, predispondo-os a rápida proliferação de microrganismos contaminantes, o que os torna alimentos perecíveis. Assim, assegurar a integridade e qualidade intrínseca do leite destinado ao consumo humano representa uma questão de grande preocupação (ÁVILA & GALLO, 1996; ZOCHE et al., 2002; BRÍCIO, SILVA, & FINGER, 2005; PINTO et al. 2011).

Vários fatores nas diferentes etapas da produção e processamento do leite influenciam a qualidade do mesmo, podendo afetar direta ou indiretamente seus derivados. A ordenha deve ser realizada em animais sadios, em ambiente com boas condições de higiene e os indivíduos responsáveis por tal procedimento devem apresentar boa saúde (WENDPAP & ROSA, 1995; AMARAL et al., 2003).

É importante ressaltar que as dificuldades de transporte e as falhas no processo de armazenamento, que devem ser realizados sob refrigeração, podem interferir diretamente na qualidade do produto. Dessa maneira, é relevante pasteurizar e comercializar o leite de acordo com os parâmetros técnicos estabelecidos pela legislação vigente, e, assim, cuidados higiênicos desde a ordenha até a obtenção do produto final devem ser empregados, tanto para o leite quanto para seus derivados (FRANCO & LANDGRAF, 1996, CATÃO & CEBALLOS, 2001).

## 2.2. Queijo Minas Frescal

Um dos principais derivados do processamento do leite é o queijo e, para muitos especialistas, a Idade Média é considerada o marco inicial na história da produção deste alimento. No entanto, tal atividade parece ser bem mais antiga, uma vez que existem relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. (PERRY, 2004). Em relação a este tipo de alimento, destaca-se o queijo Minas Frescal, por se tratar de um produto de ampla aceitação comercial e por fazer parte do hábito alimentar de boa parte da população (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001)

O queijo Minas Frescal é um alimento originalmente nacional que é produzido em vários estados, e sua fabricação no Brasil foi iniciada em Minas Gerais, nas regiões onde o gado leiteiro era dominante no século XVIII. Inicialmente, era conhecido como queijo-de-minas, dando origem aos seguintes queijos: Minas Curado ou Minas Padrão, queijo do Serro, queijo Coalho, queijo Minas Araxá, Minas Frescal, entre outros (ABREU, 1999). É um dos queijos mais populares do país, consumido por todas as camadas sociais da população, durante todo o ano (MACHADO et al., 2004; FURTADO, 2005). Minas Gerais destaca-se como um estado tradicionalmente latinicista, e a produção de queijos apresenta importância tanto econômica quanto social. Isto se deve, em parte, ao maior rendimento obtido na produção do queijo Minas Frescal e ao processamento simples de tal alimento, o que possibilita um retorno rápido do investimento e, conseqüentemente, custos mais baixos aos consumidores (BEHMER, 1991; MACHADO et al., 2004). A indústria de laticínios apresenta grande interesse pela fabricação de queijo Minas Frescal, uma vez que tal produto, além de comercialmente viável, caracteriza-se como um queijo tipicamente brasileiro, podendo ser encontrado em quase todo o território nacional (ISEPON & OLIVEIRA, 1993).

Em relação à fabricação de queijos em escala industrial, o histórico em nosso país é relativamente recente e a produção teve início a partir de 1920. Foram os imigrantes holandeses e dinamarqueses que estabeleceram tal prática nas regiões de Barbacena e Santos Dumond, em Minas Gerais, bem como no sul do referido estado (FURTADO, 1991).

O queijo Minas Frescal é um alimento fresco, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, suplementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas. É um produto de massa crua, perecível, classificado como semi-gordo de muita alta umidade (> 55 %) e não maturado, de consistência macia, cor branca, sabor suave a levemente ácido, com ou sem crosta fina, cilíndrico e pesando de 0,3 à 5 Kg (BRASIL, 1997; HOFFMAN, SILVA & VINTURIM, 2002).

Considerando-se os padrões microbiológicos vigentes, os queijos de muita alta umidade (> 55 %), como o Minas Frescal, devem apresentar as seguintes tolerâncias máximas para amostras indicativas de contaminação: ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*, número mais provável por grama inferior a  $10^3$  (NMP/g) de coliformes a 45 °C e  $10^3$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus* coagulase positivo (BRASIL, 2001).

#### 2.1.1. Fatores de risco associados à contaminação do queijo Minas Frescal

As boas práticas de fabricação e as medidas de sanitização durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade. Algumas recomendações devem ser consideradas durante a produção segura de queijos, e estas indicam a necessidade de se utilizar leite pasteurizado para minimizar os riscos à saúde (BRANT, FONSECA & SILVA, 2007). O leite destinado à fabricação de queijos deve ser de boa qualidade e, quando possível, livre de contaminação bacteriana (PERRY, 2004).

Se o leite for proveniente de gado apresentando mastite, este poderá apresentar modificação em sua composição, alterando conseqüentemente as características organolépticas, físicas, químicas e microbiológicas. Do ponto de vista econômico, a mastite é a enfermidade mais importante entre o gado leiteiro, apresentando alta prevalência em todo o mundo. É considerada uma doença multifatorial, acarretando sérios prejuízos, decorrentes da diminuição da secreção láctea ou da perda total desta capacidade, além de representar importante problema de saúde pública. Com relação a esta patologia, bactérias do gênero

*Staphylococcus* são provavelmente os agentes etiológicos mais isolados (VIANNI & LÁZARO, 2003).

A forma subclínica da mastite agrava o problema, uma vez que a falta de sinais e/ou sintomas pode favorecer a extração de leite contaminado com microrganismos patogênicos. Embora a pasteurização diminua a população microbiana presente no leite, algumas toxinas podem permanecer viáveis após a realização do processo, resultando em um risco potencial de intoxicação alimentar. Além disso, a recontaminação pode ocorrer durante as etapas da produção do queijo e representa um importante fator na qualidade final do produto, principalmente nos queijos que não são submetidos à maturação, como é o caso do queijo Minas Frescal (VIANNI & LÁZARO, 2003; PICOLI et al., 2006).

Além da utilização do leite pasteurizado, outras medidas são importantes para assegurar a produção de queijos livres de patógeno, tais como coletar e manter o leite em boas condições de higiene, manter o produto refrigerado para minimizar a multiplicação de microrganismos e fornecer condições higiênico-sanitárias adequadas, desde a fabricação até a venda aos consumidores, evitando a contaminação do produto (BRÍCIO, SILVA, & FINGER, 2005).

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os laticínios, pela própria matéria-prima que utilizam e pelo alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente susceptíveis a essa contaminação. Daí, a importância da conscientização dos profissionais do setor, em todos os níveis, para a necessidade da implementação de programas de boas práticas de fabricação e do controle permanente dos processos e seus pontos críticos (PERRY, 2004).

### 2.1.2 - Principais microrganismos contaminantes nos queijos

Os queijos de massa mole, de pH levemente ácido a ácido e umidade elevada permitem o desenvolvimento de muitos microrganismos. Várias bactérias contaminantes utilizam lactose, produzindo ácido láctico, entre outros subprodutos, e podem também produzir toxinas que resultam em toxinfecções na maioria dos casos quando ingerida (FOX et al., 2000).

Durante a transformação do leite em queijo, paralelamente à oxidação da lactose, ocorre a redução do oxigênio dissolvido. Em consequência, o interior dos queijos torna-se um ambiente essencialmente anaeróbico onde, portanto, só crescem microrganismos anaeróbicos ou e/ou facultativos. Isso significa que microrganismos exclusivamente aeróbicos, como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* e *Micrococcus* podem desenvolver-se na superfície dos queijos, mas não em seu interior (PERRY, 2004).

Perry (2004) considera que as bactérias facultativas mesófilas constituem a maioria dos contaminantes do leite e destaca, principalmente, microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e aos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Streptococcus*, além de anaeróbios do gênero *Clostridium*. Tais microrganismos apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 32°C, mas podem crescer entre 10 °C a 35 °C, o que torna de extrema importância a refrigeração adequada do produto, a fim de evitar a multiplicação microbiana.

Os coliformes que crescem a 45 °C são indesejáveis na indústria de laticínios, uma vez que diminuem a qualidade do leite e seus derivados, além de causar prejuízos à saúde do consumidor. Em alimentos processados, os coliformes indicam processamento inadequado ou uma contaminação pós-processamento (ASHTON, 1992).

Além disso, pesquisas microbiológicas realizadas com queijos do tipo Minas Frescal têm permitido o isolamento de vários patógenos de importância em saúde pública, destacando-se coliformes que crescem a 45 °C, incluindo diversos sorogrupos de *Escherichia coli*, além de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (PINTO, GERMANO & GERMANO, 1996; OLIVEIRA et al., 1998; CARVALHO, 2001; PINTO et al., 2011).

Diversos surtos de doenças têm sido associados à ingestão de produtos lácteos. Dentre os vários tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destaca-se o gênero *Staphylococcus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI & HAHN, 2000).

Os manipuladores de alimentos podem ser considerados reservatórios de inúmeros microrganismos, entre os quais destacam-se bactérias do gênero

*Staphylococcus*. O manuseio de queijos desconsiderando o controle higiênico-sanitário pode resultar em contaminação do alimento por esse microrganismo (RAPINI et al., 2004).

## 2.2 - O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo composto por 47 espécies e 24 subespécies (EUZÈBY, 2013). Estes microrganismos apresentam-se como cocos Gram positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004). Suas células ocorrem sozinhas, em pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou irregulares na forma de cachos. São microrganismos imóveis, não esporulados, normalmente catalase positivos (com exceção das espécies *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são catalase negativos) e anaeróbios facultativos. Geralmente toleram até 10 % de NaCl, com temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 37 °C (HOLT et al., 1994; BANNERMAN, 2003, KONEMAM, 2008).

Tais microrganismos são ubíquos e podem ser encontrados em vários ambientes (solo, ar e água), bem como na pele e mucosas de mamíferos tais como cavidade bucal, glândulas mamárias, e nos tratos geniturinário, respiratório e gastrintestinal dos hospedeiros. Também podem ser isolados de uma ampla variedade de gêneros alimentícios, tais como carne, leite e queijos (RHODEN & MILLER, 1995; WILKINSON, 1997; JARLOV, 1999; IRLINGER, 2008).

Os *Staphylococcus* foram observados inicialmente por Kock em 1878 descritos pela primeira vez em 1880 por um cirurgião e, atualmente, é um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (PEREIRA et al., 2000; SANTOS et al., 2007).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser classificadas em coagulase-negativos e coagulase-positivos, de acordo com sua capacidade de coagular o plasma humano através da ação da enzima coagulase (RESCH et al., 2008).

Até algum tempo atrás, SCN não despertava interesse para a saúde pública, por serem considerados meramente como microrganismos saprófitas e

contaminantes de pouca relevância clínica, não representando em geral riscos à saúde humana. Atualmente, são cada vez mais crescentes as preocupações em relação às linhagens de SCN, e estes microrganismos já são reconhecidos como agentes etiológicos de uma variedade de processos infecciosos, sendo comumente isolados a partir de amostras clínicas de humanos e outros animais. Em humanos, podem estar associados a infecções de pele e tecidos mole, bem como infecções supurativas diversas e bacteremia. No caso de amostras de animais, é cada vez mais comum a participação de tais bactérias na mastite bovina, representando significativas perdas econômicas (RICE, 2006; SOARES et al., 2008; FESSLER et al., 2010).

Entre o grupo dos coagulase-positivos, destaca-se a espécie *Staphylococcus aureus*, devido ao seu potencial patogênico e por sua prevalência tanto em infecções hospitalares como adquiridas na comunidade (SCANVIC et al., 2001; CASEY, LAMBERT & ELLIOTT, 2007).

#### 2.2.1. Principais características de virulência associadas às bactérias do gênero *Staphylococcus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são isoladas como agentes etiológicos de vários processos patológicos, seja infecção ou intoxicação, tanto em humanos quanto em outros animais (SOARES et al., 2008; VERAS et al., 2008; ARGUDÍN et al., 2012; WANG et al., 2012).

Os *Staphylooccus* spp. são capazes de formar comunidades de células microbianas envolvidas por uma matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares, denominadas biofilmes bacterianos, e que podem estar associadas tanto a superfícies bióticas quanto abióticas. Quando presente nas superfícies de equipamentos e utensílios, o biofilme é considerado um dos principais responsáveis pela contaminação microbiológica de produtos lácteos (SAUER et al., 2007; SIMÕES et al., 2006). Em geral, este tipo de comunidade se forma em virtude de falhas nos procedimentos de higienização e sua eliminação é considerada um grande desafio, uma vez que os microrganismos presentes em um biofilme se tornam muito mais resistentes aos agentes antimicrobianos e aos processos de sanitização e desinfecção convencionais (SIMÕES et al., 2006).

Como patógeno clássico, *S. aureus* é capaz de liberar um arsenal de proteínas tóxicas, dentre as quais algumas se destacam, como as enterotoxinas e hemolisinas (DINGES et al., 2000; BERGDOLL, 1989; 2001; CARMO et al., 2002). A produção de toxinas por SCN foi observada em vários estudos realizados sob condições de laboratório. Os resultados de alguns destes estudos sugerem que os *Staphylococcus* coagulase negativo também podem ser agentes etiológicos em potencial de intoxicação alimentar (BORGES et al., 2008). Bergdoll (1989) descreveu as enterotoxinas estafilocócicas como proteínas simples, de peso molecular entre 26 a 29 KDa, estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico. Apresentam propriedade de termorresistência, e esta característica faz com que a indústria alimentícia tenha um controle rigoroso, visto que as enterotoxinas podem persistir na preparação final do alimento, mesmo após o processamento térmico, sendo 0,05 µg/Kg considerada a dose tóxica mínima para provocar vômito e diarreia. Muitos tipos de enterotoxinas têm sido identificados com base em métodos sorológicos, e denominadas A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K e L. Contudo, acredita-se que cerca de 5% das intoxicações alimentares por *S. aureus* sejam causadas por toxinas ainda não identificadas, e que um terço das amostras coagulase positivas sejam produtoras de enterotoxinas (GÓMEZ-LUCIA et al., 1989, SU & WONG, 1993; DINGES et al., 2000; ORWIN et al., 2001).

Atualmente, a biologia molecular permite a utilização de uma ferramenta para detecção da sequência de nucleotídeos do gene, responsável pela informação da produção de enterotoxina pelos estafilococos. Técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem ser aplicadas para a detecção de diversos tipos de estafilococos enterotoxigênicos em culturas e alimentos (SANTANA et al., 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica é a causa mais frequente de surtos de doenças microbianas veiculadas por alimentos em todo o mundo. Dentre os principais alimentos envolvidos nestes surtos destacam-se os produtos lácteos, principalmente os queijos. No Brasil, tais surtos estão intimamente relacionados ao consumo de queijos do tipo coalho e Minas Frescal (CARMO et al., 2002; BORGES et al., 2008; SANTANA et al., 2008)

A contaminação do queijo Minas Frescal por *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positivo e negativo pode resultar em intoxicação

alimentar, representando assim, um problema de saúde pública. Se tais microrganismos estiverem presentes nos alimentos em números elevados ( $10^5$ - $10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup>) e em condições adequadas para multiplicação, como por exemplo, temperatura, pH, atividade de água e O<sub>2</sub>, estes podem produzir uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE), ocasionando possivelmente a intoxicação alimentar (BORGES et al., 2008).

Uma outra característica de virulência associada aos microrganismos do gênero *Staphylococcus*, e que contribui para a sua capacidade de colonizar o hospedeiro e causar doença, diz respeito à atividade hemolítica, que ocorre pela produção de hemolisinas (alfa e beta). Tais proteínas podem ser ativas contra eritrócitos, apresentar atividade dermonecrótica e neurotóxica (DINGES et al., 2000).

### **2.3. Fenômeno da resistência a antimicrobianos**

#### **2.3.1. História e aspectos gerais da antibioticoterapia**

O descobrimento da penicilina em 1929 e sua posterior introdução na clínica supõem uma verdadeira revolução no tratamento de doenças infecciosas. Desde então, dezenas de classes de antimicrobianos vem sendo incorporadas na prática médica (CALVO & MARTINEZ-MARTÍNEZ, 2009).

Relatos de microrganismos resistentes a antimicrobianos surgiram principalmente após a última década de 50, quando tais drogas tornaram-se amplamente utilizadas. Desde então, este problema passou a representar importância considerável em saúde pública. Estão se tornando cada vez mais limitadas, se não inexistentes, as opções de antimicrobianos para tratar infecções comuns, sendo necessário, nesses casos, usar drogas potencialmente tóxicas à saúde humana, e que podem se encontrar ainda em fase experimental (RAPINI et al., 2004).

A emergência de linhagens microbianas com níveis de resistência aos antimicrobianos variáveis e crescentes tem sido objeto de preocupação. O fenômeno é complexo e apresenta múltiplas causas, sendo algumas bem determinadas e outras ainda a ser esclarecidas. O fenômeno de resistência bacteriana é bem conhecido em ambientes hospitalares. Entretanto, os microrganismos responsáveis

por infecções tipicamente comunitárias começaram a mostrar crescentes níveis de resistência (BERQUÓ et al., 2004).

O aumento da resistência aos antimicrobianos ocorre pelo uso inadequado destes na prática médica, tanto em seres humanos e outros animais quanto em práticas utilizadas na agricultura. No que diz respeito a este uso indiscriminado, as dificuldades no estabelecimento de medidas de controle ampliam a gama de microrganismos resistentes. Adicionado a isso, células bacterianas podem transferir entre si informação de resistência, por meio de mecanismos genéticos (NORMANNO et al., 2007; SOARES et al., 2008). O fenótipo da resistência é na realidade um reflexo de um fenômeno genético, relacionado à existência de genes presentes no genoma do microrganismo. Tais genes codificam proteínas que por sua vez alteram diferentes mecanismos bioquímicos, ou que proporcionam modificações na estrutura celular impedindo assim a ação dos medicamentos (TAVARES, 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é preocupante, em virtude de tais microrganismos serem transmitidos ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. No trato gastrointestinal, pode ocorrer transferência horizontal de genes de resistência entre as bactérias da microbiota indígena. A resistência aos antimicrobianos pode ser carregada pelo cromossomo bacteriano ou outros elementos genéticos (RAPINI et al., 2004).

Existem evidências de que uso indiscriminado de antibióticos na medicina veterinária, na tentativa de prevenir e tratar animais doentes, bem como estimular o crescimento, vem aumentando cada vez mais no meio rural. Bactérias resistentes a diversos antimicrobianos são encontradas no leite de diversos animais de interesse agropecuário e, dentre estes, destacam-se os bovinos. O gênero *Staphylococcus* é o grupo predominantemente encontrado entre estes microrganismos resistentes (BONNA et al., 2007).

### 2.3.2 - Antimicrobianos e o gênero *Staphylococcus*

Espécies de *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio. A associação de métodos fenotípicos e genotípicos na identificação do perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp isolado de amostras clínicas de

seres humanos e animais fornece ferramentas para um diagnóstico mais acurado, capaz de determinar a prevalência destes estafilococos como agentes etiológicos de infecções e de proporcionar o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação das linhagens resistentes (COELHO et al., 2007).

Oliveira e colaboradores (2000) relatam que bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentam elevada capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos. A introdução da penicilina na prática médica melhorou muito o prognóstico de pacientes acometidos por infecções estafilocócicas. No entanto, aproximadamente dois anos depois, surgiram os primeiros relatos de resistência ao medicamento. No final dos anos 60, a taxa de resistência hospitalar e comunitária aproximava-se de 90 % e 70 %, respectivamente. Atualmente, esse antimicrobiano é muito pouco eficaz contra bactérias do gênero *Staphylococcus* (MÍMICA & MENDES, 2007). Tal resistência é mediada pela produção da enzima penicilinase, uma  $\beta$ -lactamase, codificada pelo gene *blaZ* (KAASE et al., 2008).

O gene *blaZ*, que codifica a informação da produção de  $\beta$ -lactamases, pode estar localizado em elementos móveis no DNA cromossômico ou plasmidial da bactéria. Uma vez que o microrganismo é capaz de produzir uma  $\beta$ -lactamase, esta enzima inativa o antimicrobiano por meio da destruição hidrolítica do anel  $\beta$ -lactâmico. As bactérias com o gene *blaZ* podem se dispersar por meio da reprodução ou ainda por disseminação horizontal do gene de resistência (LYON & SKURRAY, 1987; AARESTRUP & SCHWARZ, 2006; PINHO, 2008; MALACHOWA & DeLEO, 2010).

Na tentativa de resolver o problema da resistência bacteriana associada à penicilina, relacionada principalmente à produção da enzima  $\beta$ -lactamase, a indústria farmacêutica introduziu nos final da última década de 50 a utilização de meticilina e oxacilina, fato que representou um passo muito significativo na terapia anti-estafilocócica (MARTINS e CUNHA, 2007). No entanto, já nos anos 60 surgiram os primeiros relatos de linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), fato que provavelmente foi considerado uma séria ameaça ao tratamento de infecções estafilocócicas em todo o mundo. Inicialmente, as amostras de MRSA eram restritas aos centros médicos de referência e aos hospitais de nível terciário, porém, se dispersaram rapidamente para outros serviços de saúde, bem como foram isolados

também a partir da comunidade, em animais e até mesmo em alimentos (DOYLE, HARTMANN & WONG, 2012).

A resistência à meticilina também vem sendo amplamente disseminada entre os *Staphylococcus* coagulase negativo (JOHN et al., 2009). Bactérias do gênero *Staphylococcus*, em particular MRSA e *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina (MRSCNS) são importantes patógenos associados tanto a infecções hospitalares quanto a infecções adquiridas na comunidade, em todo o mundo (BROEKEMA et al., 2008).

Tanto MRSA quanto MRSCNS produzem uma proteína de ligação à penicilina adicional, PBP2a, codificada pelo gene *mecA*, que é expresso heterogeneamente. O gene *mecA* encontra-se inserido em um elemento genético móvel, o chamado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). A detecção do gene *mecA* ou PBP2a é considerada o “padrão de ouro” para a determinação de resistência à meticilina em *Staphylococcus* (BROEKEMA et al, 2008; JOHN et al., 2009).

Os *Staphylococcus* que possuem o gene *mecA* podem expressar esta resistência tanto heterogeneamente quanto homogeneamente. A expressão heterogênea pode resultar ocasionalmente em concentrações inibitórias mínimas que parecem ser limítrofes e, conseqüentemente, os isolados podem ser interpretados como susceptíveis (ANAND et al., 2009).

Na resistência heterogênea, todas as células bacterianas carregam o gene *mecA*, entretanto, este é expresso apenas por um percentual de células. Por causa deste fenômeno, podem ocorrer falhas nos testes de rotina responsáveis pela detecção de resistência a meticilina em bactérias do gênero *Staphylococcus*. Assim, caso não seja possível realizar testes para a detecção do gene *mecA*, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) recomenda a utilização do método de difusão de disco com cefoxitina, uma vez que esse antimicrobiano é considerado um melhor indicador do que a oxacilina para determinar a resistência heterogênea à meticilina. Os resultados obtidos com a cefoxitina são mais fáceis de serem interpretados e mostram-se mais sensíveis à detecção de resistência à meticilina mediada por *mecA* (BROEKEMA et al, 2008; JOHN et al., 2009).

Adicionalmente, MRSA e MRSCN são importantes em virtude da resistência cruzada contra quase todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos e outras classes de antimicrobianos. Os aminoglicosídeos, tais como gentamicina e tobramicina, são

frequentemente usados em combinação com  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos. Os *Staphylococcus* apresentam resistência aos aminoglicosídeos por meio de modificação enzimática (EMANEINI et al., 2009).

Algumas bactérias do gênero *Staphylococcus* produzem a enzima bifuncional AAC(6')/APH(2''), que é codificada pelo gene *aac(6')-aph(2'')* e é capaz de inativar uma ampla faixa de aminoglicosídeos, tais como gentamicina, tobramicina e amikacina (MARTINEAU et al., 2000, EMANEINI et al., 2009).

Além da resistência a estes antimicrobianos já citados, existem relatos na literatura apontando *Staphylococcus* coagulase negativo isolados de leite de vaca com mastite subclínica e clínica apresentando resistência também aos macrolídeos e lincosamidas. Os antimicrobianos são comumente utilizados em animais em fase de lactação e como terapia de bovinos magros para controle de bactérias associadas à mastite, em fazendas leiteiras (SIMEONI et al., 2008; SAWANT, GILLESPIE & OLIVER, 2009; HUBER et al., 2011).

A resistência à eritromicina e azitromicina em bactérias do gênero *Staphylococcus* está normalmente associada com a resistência a outros macrolídeos. Estudos mostram que tais bactérias podem ser portadoras dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, que codificam metilases. Outro mecanismo de resistência à eritromicina é conferido pelos genes *mrsA* e *mrsB*, que codificam a informação de uma bomba de efluxo dependente de ATP. Tal gene confere resistência também às estreptograminas tipo B nos estafilococos (CHAIEB et al., 2007).

Os estafilococos apresentam resistência à tetraciclina tanto por modificação ribossomal codificada pelo gene *tetM* quanto mediada pelo gene *tetK* (STROMMINGER et al., 2003).

Em muitos casos, os glicopeptídeos são a única alternativa terapêutica contra MRSA, em especial, a vancomicina, que inibe a síntese da parede celular e é utilizada na prática médica desde 1958. A resistência de linhagens de *Staphylococcus* a vancomicina não foi relatada nos primeiros 20 anos após sua aplicação clínica, mas, infelizmente, em 1979 e 1983 foram relatados casos de resistência em *Staphylococcus* coagulase negativo e, a partir de 1997, surgiram os primeiros relatos de resistência de linhagens de *S. aureus* (OLIVEIRA et al., 2000; SRINIVASAN et al., 2002). No entanto, recentemente, vem surgindo o interesse com relação a efetividade da vancomicina no tratamento de infecções por *S. aureus*. O

CLSI, em resposta a este interesse, reduziu os pontos de corte de susceptibilidade e resistência da vancomicina contra tal bactéria (JOHN et al., 2009).

Infelizmente já existem alguns relatos sugerindo que as bactérias do gênero *Staphylococcus* que apresentam multirresistência podem se tornar um problema emergente para a medicina humana e veterinária (SIMEONI et al., 2008; HUBER et al., 2011).

Além da preocupante resistência aos antimicrobianos no gênero *Staphylococcus*, diversos autores tem relatado diminuição na susceptibilidade e até mesmo resistência bacteriana aos antissépticos e desinfetantes de uso clínico e industrial por estes microrganismos (HEIR, SUNDHEIM, HOLCK, 1999; ALAM et al., 2003).

Esta observação torna-se relevante à medida que os mecanismos de resistência são evidenciados e nota-se possibilidade de resistência cruzada às drogas de uso terapêutico, com grande impacto nos serviços de controle de infecções (CORREA et al., 2008). Diversos marcadores genéticos tem sido relacionados à expressão de habilidades bacterianas no gênero *Staphylococcus* associadas à susceptibilidade diminuída aos antissépticos e desinfetantes. Assim, linhagens que apresentam tais genes são consideradas linhagens resistentes. (LYON & SKURRY, 1987).

Do ponto de vista bioquímico-molecular, a diminuição na susceptibilidade microbiana a antissépticos e detergentes catiônicos tem sido atribuídos principalmente à sua excreção para o meio extracelular por sistema de transporte-multidroga dependente de força de gradiente de prótons. Em *S. aureus* os genes da família *qacA/B*, *smr* localizados em plasmídeos e *norA* localizado em cromossomo, codificariam para proteínas de transporte-multidroga (*qacA/B* e *smr*), ou mutação no regulador transcricional que resultaria em uma superexpressão de *norA* RNAm. Desta forma os microrganismos apresentariam resistência aos agentes catiônicos como compostos quaternários de amônio (cloreto de benzetônio, cloreto de benzalcônio), biguanidas (digluconato de clorexidina), além de corantes tais como acriflavina, acrinol, brometo de etídio (NOGUCHI et al., 2005).

Do exposto, percebe-se a relevância da resistência bacteriana para Saúde Pública. Evidências indicam que o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos pela sociedade atual, nos diversos setores rurais e urbanos como manejo animal e cadeia produtiva de alimentos, dentre outros não ligados diretamente à área de saúde, pode selecionar bactérias resistentes que são passíveis de serem transferidas entre espécies.

Devido à riqueza de nutrientes, a produção e a acessibilidade, o queijo Minas Frescal constitui um alimento importante no nosso meio. Desta forma, considerando este produto como veículo de disseminação de microrganismos putativos como os *Staphylococcus*, e de seus marcadores de resistência a drogas, percebe-se a necessidade de geração de conhecimento, que possa contribuir para a contenção deste fenômeno.

Este estudo está inserido na linha de pesquisa “Identificação e caracterização genética de microrganismos de importância humana e animal”, em desenvolvimento no Núcleo de Pesquisas em Doenças Infecto-parasitárias do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF e pretende contribuir com dados regionais sobre a ocorrência de *Staphylococcus*, seu perfil de susceptibilidade e a distribuição de marcadores genéticos de resistência como determinantes da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal e a sua circulação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo Geral:**

Avaliar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas e as principais características de virulência, bem como a ocorrência de marcadores moleculares associados à resistência em microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de amostras de queijo do tipo Minas Frescal na cidade de Juiz de Fora, MG.

#### **3.2 – Objetivos específicos:**

- Isolar, identificar presuntivamente e quantificar *Staphylococcus* spp. a partir de amostras de queijos do tipo Minas Frescal, comercializados em Juiz de Fora/MG;

- Identificar, pela técnica de PCR, as amostras presuntivamente identificadas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativo isoladas dos queijos do tipo Minas Frescal;

- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de relevância clínica humana e animal de uso comunitário e hospitalar das linhagens bacterianas recuperadas;

- Pesquisar determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos de uso comunitário e hospitalar e de resistências a biocidas nas linhagens de *Staphylococcus*, isoladas de queijos do tipo Minas Frescal;

- Avaliar características fisiológicas associadas à virulência bacteriana, por exemplo, produção de DNase, capacidade de formação de biofilme e produção de hemolisina, entre as amostras de *Staphylococcus* isoladas de queijos do tipo Minas Frescal.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Durante os meses de setembro de 2009 a agosto de 2010 foram obtidas 35 amostras de queijo Minas Frescal de 7 marcas diferentes (classificadas como A, B, C, D, E, F e G), sendo 5 lotes de cada marca. Todos os queijos avaliados no presente trabalho continham o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foram vendidos sob refrigeração e adquiridos em supermercados da cidade de Juiz de Fora/MG. As amostras foram transportadas em caixa de material isotérmico até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo mantidas sob refrigeração até o momento das análises microbiológicas que foram realizadas em no máximo 2 horas. A desinfecção da embalagem de cada amostra de queijo foi realizada com o auxílio de álcool 70 % antes do rompimento da mesma.

### 4.1. Processamento das amostras:

A partir de cada queijo foi obtida uma amostra de 25 g que foi macerada em uma placa de petri estéril com auxílio de uma espátula também estéril. Esta amostra foi adicionada à uma solução de 225 mL de água peptonada (peptona 0,1 %, Difco) para obtenção da diluição inicial  $10^{-1}$ . A partir da diluição  $10^{-1}$ , foi coletado 1 mL e o mesmo foi diluído em 9 mL de água peptonada (0,1 %) em um tubo de ensaio de vidro estéril, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . Tal procedimento foi repetido até a diluição  $10^{-6}$ .

Para o isolamento de microrganismos, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas, utilizando alça de Drigalski, em duas placas de Petri: uma contendo o meio de cultura sólido ágar manitol (HiMedia, Mumbai, Índia), e a outra contendo o meio de cultura sólido ágar manitol acrescido de oxacilina na concentração de 6 µg/mL (CLSI, 2012). A seguir, as placas foram incubadas a 35,5 °C por 48 horas.

Todos os espécies isolados foram preservados em caldo de congelamento, constituído por uma infusão de cérebro e coração de boi (Brain Heart Infusion –BHI)

(HiMedia, Mumbai, India) acrescido de 10 % de glicerol. Estas amostras foram estocadas em Freezer -20 °C.

#### **4.2. Identificação presuntiva das amostras**

A partir do crescimento bacteriano, foi realizada a contagem presuntiva do número de colônias fermentadoras e não fermentadoras de manitol. As colônias obtidas no ágar manitol foram testadas quanto a produção das enzimas catalase, e DNase. A verificação microscópica morfo-tintorial de todas as amostras isoladas (fermentadoras ou não) foi realizada pelo método de Gram. Subcultivos das amostras recuperadas foram feitos em ágar Mueller-Hinton (HiMedia, Mumbai, India) para obtenção de culturas puras. As amostras recuperadas a partir do ágar manitol acrescido de oxacilina foram cultivadas sempre em meio contendo 6 µg/mL do antimicrobiano (CLSI, 2012).

O teste de verificação de produção da enzima catalase foi realizado a partir da adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) às colônias. Considerou-se o teste positivo quando houve liberação de bolhas de oxigênio (BRASIL, 2003).

Para o teste da enzima DNase as amostras foram cultivadas em ágar DNase (HiMedia, Mumbai, India) e incubadas a 35,5 °C por 24 horas. Após este período foi adicionado 1 mL de solução ácida 1N. Após 5 minutos, quando o teste foi positivo, pode-se ser observar a produção de um halo claro ao redor das colônias (BRASIL, 2003).

#### **4.3. Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras bacterianas isoladas e identificadas foi avaliado pelo método de diluição em ágar, tal como recomendado pelo CLSI (CLSI, 2012).

Os antimicrobianos utilizados neste estudo foram: penicilina G, oxacilina, vancomicina, gentamicina, tetraciclina, levofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol, eritromicina, azitromicina, linezolida, clindamicina e rifampicina (Sigma).

As soluções dos antimicrobianos foram previamente preparadas como solução estoque, obtidas pela pesagem do sal puro em balança analítica e posterior diluição em água destilada, esterilizadas em filtro do tipo Millipore (Millipore) de 0,22 µm, conservadas em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Foram utilizadas as concentrações que variam de 0,0625 a 1.024,0 µg/mL das drogas a serem avaliadas.

Concentrações crescentes dos antimicrobianos foram incorporadas ao ágar Mueller Hinton (40mL) (HiMedia, Mumbai, India) contido em garrafas de vidro e vertidas em 2 placas de Petri previamente esterilizadas, para realização do teste em duplicata.

Os inóculos das amostras testadas foram cultivados em meio sólido e diluídos em caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, India), para se obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de MacFarland, o que corresponde a  $10^5$  UFC/ponto. Os inóculos foram semeados sempre em duplicata, em meio contendo a droga com o auxílio de replicador de Steers (STEERS et al., 1959), em ordem crescente das concentrações. Placas controle de viabilidade foram inoculadas em meios sem adição de antimicrobiano.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35,5 °C, por 24 horas.

Amostras de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e ATCC 29213 foram utilizadas como controles positivos para resistência e sensibilidade, respectivamente, nos testes com os antimicrobianos.

Os resultados foram comparados à tabela de referência (Anexo A).

#### 4.3.1. Determinação do índice de múltipla resistência aos antimicrobianos

A partir dos resultados das CIM, o índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) foi calculado como o número de drogas ao qual determinado isolado bacteriano foi resistente, sobre o número total de drogas testadas (no caso 13 drogas). O índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

#### 4.4. Extração de DNA bacteriano

O DNA genômico das amostras bacterianas isoladas foi extraído pelo método de digestão química em fenol-clorofórmio, de acordo com Giraffa et al. (2000), com modificações.

Massas celulares das linhagens de *Staphylococcus* sp. foram obtidas a partir de um crescimento de 24 horas em Tryptic Soy Agar (TSA) (HiMedia, Mumbai, Índia) a 35°C, com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis. Quinhentos µL de solução de lise bacteriana (NaCl 200 mM, EDTA 20 mM, Tris HCl 20 mM pH 8,0, SDS a 4 %, lizosima 20µg/L) foram adicionados e as amostras foram incubadas a 35,5 °C, por 60 minutos, em banho-maria. Posteriormente, 50 µL de SDS 20 % foram adicionados e as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Quinhentos µL de fenol-tris-equilibrado pH 8,0 e 500 µL de clorofórmio-alcool isoamílico (24:1) foram adicionados e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e colocada em novo tubo, e mais 500 µL de clorofórmio-alcool isoamílico (24:1) foram adicionados. As amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e transferida para novo tubo. A esta solução o novo tubo foram adicionados 50 µL de acetato de potássio (5M) e 1,2 mL de etanol gelado (ice cold). A solução foi gentilmente homogeneizada e o sistema incubado por toda a noite a -20°C para precipitação do DNA. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi desprezado e 200 µL de solução de TE foram adicionados para suspender o DNA. A concentração de DNA foi medida em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 260 nm , e foi estocado em freezer a -20° C.

#### **4.5. Caracterização molecular das amostras bacterianas.**

Os isolados bacterianos identificados presuntivamente como *Staphylococcus* spp. tiveram sua identidade confirmada por biologia molecular, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS, 1990). Além disso, na mesma reação, foi realizada a pesquisa do gene *mecA*, relacionado à resistência à oxacilina. Outras reações foram realizadas para a pesquisa de genes de interesse, como a seguir: (i) o gene *coa*, relacionado à produção da enzima coagulase; (ii) confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* nas amostras positivas para os testes da coagulase e DNase; (iii) detecção de genes relacionados à produção das

enterotoxinas A, B, C e D. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações, o tamanho dos amplicons esperados, as condições utilizadas em cada uma das reações e as respectivas referências são representados na tabela 1. Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5 %, em tampão Tris-borato EDTA 1X. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, United Kingdom), após tratamento com brometo de etídio (Promega Corporation).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizadas na caracterização bacteriana.

Oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Amplicon (bp)	Condições da PCR	Referência
<i>Staph756F</i>	AAC TCT GTT ATT GAA GAA CA	750	94°C 5min; 10 x (94°C 40 s, 58°C 40s, 72°C 1min); 25 x (94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 2min); 72° 10min	ZHANG et al., 2004
<i>Staph750R</i>	CAA CCT TCC GGT TTG TCA CC			
<i>mecA1</i>	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310		
<i>mecA2</i>	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A			
<i>coa1</i>	ACC ACA AGG TAC TAG ATC AAC G	Variável	95 °C 30s; 40 x (95°C 30s, 55°C 2min, 72°C 2min); 72°C 5min	AAERESTRUP et al., 1995
<i>coa2</i>	TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC			
<i>SA1</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	276	95 °C 10 min; 32 x (95 °C 15 s, 55 °C 10 s, 72 °C 15 s), 72 °C 10 min	FUKUSHIMA, TSUNOMORI & SEKI, 2003
<i>SA2</i>	CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC			
<i>sea1</i>	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	521		
<i>sea2</i>	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG			
<i>seb1</i>	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	667	95°C, 10min; 15 x (95°C, 1min, 68°C 45s, 72°C 1min); 20 x (95°C 1min, 64°C 45s, 72°C 1min); 72°C 1min	LOVSETH et al., 2004
<i>seb2</i>	TCG AGG CAT CAT GTC ATA CCA			
<i>sec1</i>	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TA CAA	284		
<i>sec2</i>	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA			
<i>sed1</i>	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C	385		
<i>sed2</i>	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G			

#### 4.5.1. Identificação molecular de marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas

O mesmo DNA previamente extraído das amostras bacterianas foi utilizado em reações de PCR subsequentes para a pesquisa de marcadores genéticos relacionados à resistência aos antimicrobianos e aos biocidas.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações, bem como o tamanho dos amplicons esperados, as condições utilizadas em cada uma das reações e as respectivas referências são representados na tabela 2. Tal como descrito anteriormente, os amplicons foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em transluminador de luz ultravioleta.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizada na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas.

Gene	Fenótipo de resistência	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Condições de amplificação	Amplicon	Referência
<i>mecA</i>	Beta-lactâmicos resistentes a penicilinas	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 10x: 94°C, 40s; 58°C, 40s; 72°C, 1mim, 25x: 25 x 94°C, 1min, 50°C 1min, 72°C 2min, Extensão final: 72°C, 15 mim	310 bp	ZHANG et al., (2004)
<i>blaZ</i>	Beta-lactâmicos	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACTTTTATCAGCAACC	Desnaturação inicial 95°C, 5 min, 35x: 95°C, 30s; 52°C, 30s; 72°C, 1mim, Extensão final: 72°C, 1 mim	173 bp	MARTINEAU et al., (2000)
<i>msrA</i>	Macrolídeos	TCCAATCATAGCACAAAATC AATTCCCTCTATTTGGTGGT	Desnaturação inicial 95°C, 5 min, 35x: 95°C, 30s; 52°C, 30s; 72°C, 1mim, Extensão final: 72°C, 1 mim	163 bp	CHAIIEB et al., (2007)
<i>msrB</i>	Macrolídeos	TATGATATCCATAATAATTATCCAATC AAGTTATATCATGAATAGATTGCTCTGTT	Desnaturação inicial 95°C, 5 min, 35x: 95°C, 30s; 52°C, 30s; 72°C, 1mim, Extensão final: 72°C, 1 mim	595 bp	LINA et al., 1999
<i>ermA</i>	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 30s, Extensão final: 72°C, 4 mim	190 bp	MARTINEAU et al., (2000)
<i>ermB</i>	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 30s, Extensão final: 72°C, 4 mim	142 bp	MARTINEAU et al., (2000)
<i>ermC</i>	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	AATCGTCAATTCCTGCATGT TAATCGTGG AATACGGGTTTG	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 30s, Extensão final: 72°C, 4 mim	299 bp	MARTINEAU et al., (2000)
<i>linA</i>	Lincosamidas	GGTGGCTGCGGGGTAGATGTATTAAC TG GCTTCTTTT GAAATACATGGTATTTTTCGAT	Desnaturação inicial 94°C, 4 min, 25x: 94°C, 30s; 57°C, 30s; 72°C, 1mim, Extensão final: 72°C, 1 mim	323 bp	LINA et al., 1999
<i>aac-aphD</i>	Aminoglicosídeos	TAATCCAAG AGCAATAAGGGC GCCACACTATCATAACCACTA	Desnaturação inicial 95°C, 5 min, 35x: 95°C, 30s; 52°C, 30s; 72°C, 1mim, Extensão final: 72°C, 1 mim	227 bp	STROMMINGER et al., (2003)
<i>qacA/B</i>	Biocidas	GCAGAAAGTGCAGAGTTCCG CCAGTCCAATCATGCCTG	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 25x: 94°C, 20s; 53°C, 20s; 72°C, 20s, Extensão final: 72°C, 5 mim	361 bp	NOGUCHI et AL. 2005
<i>smr</i>	Biocidas	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 25x: 94°C, 20s; 53°C, 20s; 72°C, 20s, Extensão final: 72°C, 5 mim	195 bp	NOGUCHI et al. 2005

#### **4.7. Avaliação da habilidade de formação de biofilmes**

A verificação da habilidade na formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Andrade (2010). A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em caldo TSB (HiMedia) de todas as linhagens bacterianas, 400  $\mu$ L de cultura foram utilizados para uma diluição em 4 mL de meio que, depois de homogeneizado, foi aplicado em poços de placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (200  $\mu$ L).

As placas foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Após o período de crescimento, foi retirado o caldo de cultivo com o auxílio de uma pipeta esterilizada e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85 %) esterilizada. Posteriormente, foram adicionados 300  $\mu$ L de metanol em cada um dos poços e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, o metanol foi removido e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente por 5 minutos, para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250  $\mu$ L de cristal violeta (0,1%) em cada poço e as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas.

O corante incorporado foi extraído pela adição de 300  $\mu$ L de uma solução de etanol/acetona (8:2). O sistema foi deixado em repouso por 15 minutos tampado. Após este período, foi feita a leitura do corante solubilizado em leitor de Elisa a 590nm. Estes experimentos foram realizados em duplicata, em duas réplicas, para obtenção de valores médios, que foram plotados como corante solubilizado a partir das células bacterianas aderidas aos poços das placas utilizadas.

#### **4.8. Avaliação da atividade hemolítica**

A atividade hemolítica foi avaliada em placas de Petri contendo ágar TSA (HiMedia) acrescido de 5 % de sangue de carneiro. Cada isolado bacteriano a ser testado foi inoculado com auxílio de uma micropipeta automática, em um volume de 10  $\mu$ L, e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O registro de uma zona clara ou esverdeada ao redor do crescimento bacteriano foi classificado como  $\beta$  e  $\alpha$ -

hemólise, respectivamente, e a ausência de halo representou ausência de hemólise e, conseqüentemente, ausência de atividade hemolítica. Tal atividade foi avaliada da maneira previamente descrita (QUIBLIER et al., 2011).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento e identificação das amostras.

A partir da análise das 35 amostras de queijo Minas Frescal (QMF) foram obtidos 246 isolados bacterianos, os quais foram identificados presuntivamente como bactérias do gênero *Staphylococcus*. Posteriormente, a identidade destes microrganismos foi confirmada por biologia molecular como bactérias pertencentes a tal gênero. Utilizando-se ainda a biologia molecular, do total de isolados bacterianos, 19 amostras foram identificadas como *Staphylococcus aureus* e 227 amostras foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativo.

A contagem de unidade formadora de colônias (UFC) por grama de queijo foi realizada após o crescimento microbiano para cada uma das sete marcas de queijo avaliadas, incluindo todos os cinco lotes do produto.

As linhagens de *S. aureus* foram recuperadas a partir das marcas de QMF B, E, F e G. As amostras obtidas dos queijos B e E foram isoladas em apenas um lote de cada marca avaliada, representando uma amostra para cada queijo. No que se refere às linhagens de *S. aureus* recuperadas a partir dos queijos F e G, tais microrganismos foram obtidos de 3 e 4 lotes, respectivamente, como pode ser observado na tabela 3.

**Tabela 3.** Contagem média de *S. aureus* (UFC/g) recuperadas das 35 amostras de queijo avaliadas, considerando as 7 marcas diferentes de QMF estudadas.

Marcas de queijo	Nº de morfotipos bacterianos	Nº de lotes positivos para recuperação de <i>S. aureus</i>	Média de UFC/g de queijo
B	1	1	$2 \times 10^6$
E	1	1	$2 \times 10^3$
F	13	3	$7,3 \times 10^6$
G	4	4	$7 \times 10^5$

Todas as 35 amostras de QMF avaliadas neste estudo foram positivas com relação à presença de SCN. A contagem de UFC/g de queijo das 227 linhagens de tais microrganismos variou de  $1,1 \times 10^5$  a  $9,2 \times 10^7$ , e a média destes valores por marca de QMF é representada no gráfico 1, onde se observa todos os valores acima de  $5 \times 10^3$ , valor máximo permitido pela legislação brasileira para a contagem de *S. aureus* (BRASIL, 2001).

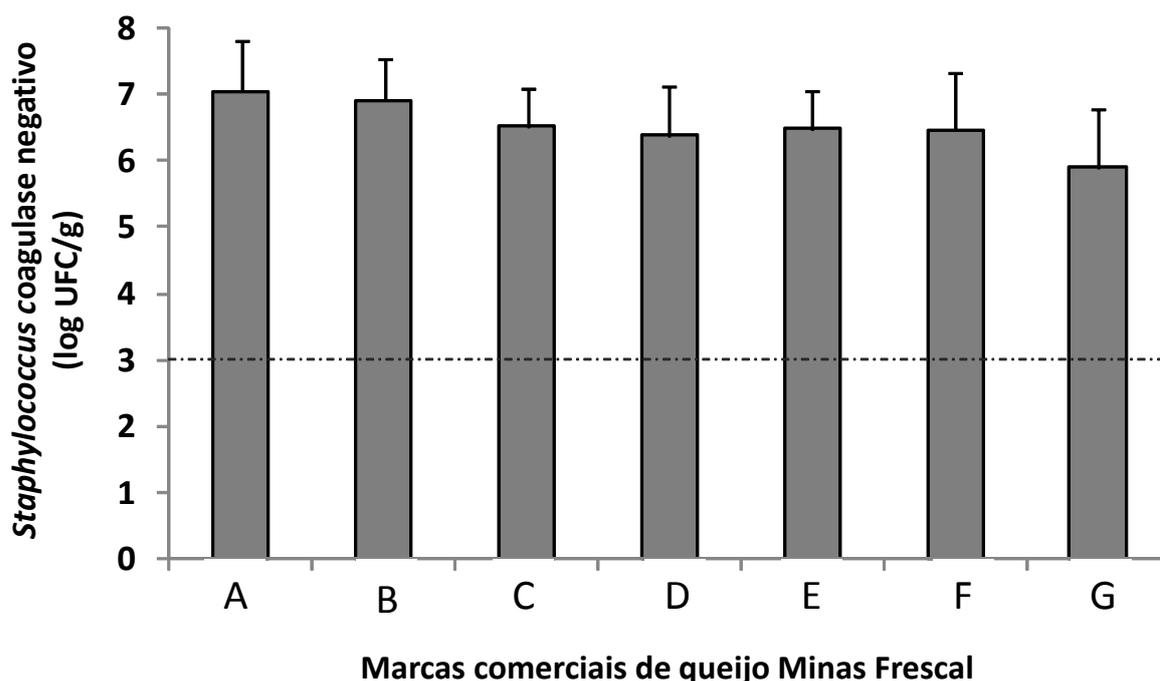


Gráfico. 1. Média da contagem de *Staphylococcus coagulase negativo* (log UFC/g) por marca comercial de queijo. Cinco lotes diferentes foram avaliados representativamente a partir de cada marca comercial de queijo (A-G). A linha pontilhada representa a contagem máxima de *Staphylococcus aureus* permitida, de acordo a legislação sanitária brasileira, para consumo seguro do alimento (Brasil 2001).

Ainda em relação às 227 linhagens de SCN, é importante destacar que 67 amostras foram isoladas do meio seletivo acrescido de oxacilina, representando um total de 29,5 %. Todas as 67 amostras se mostraram multirresistentes aos antimicrobianos testados e apenas 5 não apresentaram o gene *mecA*, que confere informação de resistência ao antimicrobiano em questão.

## 5.2. Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens de SCN e *S. aureus* isoladas neste estudo é mostrado nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Em relação ao perfil de susceptibilidade das 227 linhagens de SCN avaliadas, os antimicrobianos menos eficientes foram a penicilina G, oxacilina e eritromicina, com percentuais de resistência bacteriana acima de 67 %. Percentuais associados a pouca eficiência dos antimicrobianos também são observados para gentamicina e

clindamicina, apresentando 47,2 % e 35,7 % de resistência, respectivamente. Quanto a estes antimicrobianos, observou-se ainda resistência intermediária de 31,6 % e 20,1 %, respectivamente. A resistência de 14,7 %, 14,2 % e 11,7 % também foi encontrada para tetraciclina, levofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim, respectivamente, sendo observada também resistência intermediária de 86,6 % para este último antimicrobiano. Apesar das amostras de SCN apresentarem sensibilidade à rifampicina de 61,6 %, observou-se resistência intermediária de 11,6 % com relação a este antimicrobiano. Finalmente, a azitromicina, cloranfenicol, vancomicina e linezolida foram os antimicrobianos mais eficientes, com percentuais de sensibilidade bacteriana de 76,3 %, 97,7 %, 100 % e 100 %, respectivamente.

As 19 linhagens de *S. aureus* recuperadas neste estudo apresentaram um perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos semelhante àquele de SCN, como pode ser observado na tabela 3. Os antimicrobianos que se mostraram mais eficientes foram a vancomicina, azitromicina, linezolida e rifampicina, apresentaram todos 100 % de sensibilidade, bem como a tetraciclina, levofloxacina, cloranfenicol e clindamicina que apresentam percentuais de sensibilidade de 73,7 %, 84,2 %, 94,7 % e 84,1 %, respectivamente. O antimicrobiano menos eficiente foi a penicilina G, apresentando um percentual de resistência de 89,5 %. Percentuais associados a pouca eficiência dos antimicrobianos também são observados para oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim e eritromicina, apresentando 42,1 %, 47,4 % e 42,1 % de resistência, respectivamente. A resistência de 21,1 % e 26,3 % também foi encontrada para gentamicina e tetraciclina. Tais microrganismos apresentaram ainda resistência intermediária a eritromicina, gentamicina e clindamicina, com percentuais de 52,6 %, 21 % e 10,6 %, respectivamente.

**Tabela 4.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos com relação aos 227 isolados de *Staphylococcus coagulase negativo* obtidos de 35 amostras de queijo Minas Frescal, representado por amostras sensíveis (S), com resistência intermediária (RI) e resistentes (R).

Antimicrobianos	Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ )			Padrões de susceptibilidade (%)		
	CIM <sub>50%</sub>	CIM <sub>90%</sub>	Variação	S	RI	R
	(n)	(n)				
Penicilina G	2	4	0,0625->1024	13,8	7,7	78,5
Oxacilina	16	64	0,125-1024	23,8	-	76,2
Vancomicina	2	4	0,25-4	100	-	-
Gentamicina	8	32	0,125-1024	21,2	31,6	47,2
Tetraciclina	0,5	32	0,125-128	84,5	0,8	14,7
Levofloxacina	1	4	0,125->1024	78,9	6,9	14,2
Sulfametoxazol-trimetropim	2	8	0,125->1024	1,7	86,6	11,7
Cloranfenicol	8	8	8-64	97,7	-	2,3
Eritromicina	16	>1024	0,0625->1024	9,8	22,4	67,8
Azitromicina	1	128	0,0625->1024	76,3	9	14,7
Linezolida	1	4	0,0625-4	100	-	-
Clindamicina	1	32	0,0625-1024	44,2	20,1	35,7
Rifampicina	0,25	8	0,0625-32	61,6	11,6	26,8

**Tabela 5.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos com relação aos 19 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de 35 amostras de queijo Minas Frescal, representado por amostras sensíveis (S), com resistência intermediária (RI) e resistentes (R).

Antimicrobianos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			Padrões de susceptibilidade (%)		
	CIM <sub>50%</sub>	CIM <sub>90%</sub>	Varição	S	RI	R
	(n)	(n)				
Penicilina G	0,5	2	0,125->1024	10,5	-	89,5
Oxacilina	0,5	32	0,25-256	57,9	-	42,1
Vancomicina	1	2	0,5-4	100	-	-
Gentamicina	2	32	1-32	57,9	21	21,1
Tetraciclina	0,5	64	0,25-128	73,7	-	26,3
Levofloxacina	0,5	2	0,25-4	84,2	5,3	10,5
Sulfometoxazol-trimetoprim	2	4	1-16	52,6	-	47,4
Cloranfenicol	4	8	4-64	94,7	-	5,3
Eritromicina	4	8	0,5->1024	5,3	52,6	42,1
Azitromicina	0,25	1	0,06-1	100	-	-
Linezolida	0,5	2	0,5-2	100	-	-
Clindamicina	0,12	1	0,06-16	84,1	10,6	5,3
Rifampicina	0,06	0,12	0,06-0,12	100	-	-

### 5.3. Detecção e distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e biocidas

A distribuição de marcadores genéticos associados à resistência aos antimicrobianos e aos biocidas na população bacteriana amostrada é apresentada na tabela 6.

Em relação às 7 marcas de QMF avaliadas (A-G), os determinantes genéticos *blaZ*, *mecA*, *msrA*, *msrB*, *linA*, *aacA-aphD*, bem como o marcador genético associado à resistência aos biocidas *smr*, foram detectados em isolados bacterianos de todas as marcas de QMF avaliadas.

Os marcadores genéticos *mecA* e *blaZ*, que codificam informação de resistência à meticilina/oxacilina e aos  $\beta$ -lactâmicos, respectivamente, foram os marcadores genéticos mais frequentes para SCN, com frequência de detecção de 74 % e 64,3 %, respectivamente. O marcador *blaZ* também foi o mais frequente para as 19 linhagens de *S. aureus* recuperadas, exibindo frequência de detecção de 84,2 %. Ainda em relação a estas linhagens, o marcador genético *mecA* apresentou frequência de detecção de 47,4 %.

Em relação aos macrolídeo e lincosamidas, os marcadores *mrsA* e *msrB* que codificam informação de resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, e *linA* que codifica informação de resistência às lincosamidas, foram os mais frequentes nas linhagens de SCN recuperadas, apresentando frequências de detecção de 59,5 %, 56 % e 45,4 %, respectivamente. Tais marcadores genéticos também foram os mais frequentes para as 19 linhagens de *S. aureus*, com os respectivos percentuais de 56,6 %, 36,8 % e 26,3 % para *linA*, *msrA* e *msrB*.

Ainda em relação aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, os marcadores genéticos *ermA*, *ermB* e *ermC* foram encontrados apenas em algumas linhagens de SCN, apresentando frequências de detecção de 1,8 %, 3,5 % e 1,3 %, respectivamente.

O marcador genético *qac*, que codifica informação de resistência aos biocidas, também foi encontrado apenas em algumas amostras de SCN, com frequência de detecção de 5,7 %.

**Tabela 6.** Detecção e distribuição dos determinantes genéticos relacionados à resistência aos antimicrobianos e biocidas entre as amostras de *Staphylococcus* isoladas das 7 marcas de queijo Minas Frescal.

Marca comercial de queijo Minas Frescal	Microrganismos avaliado (n)	Frequência de detecção dos marcadores moleculares de resistência aos antimicrobianos e biocidas (%)										
		<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>msrB</i>	<i>linA</i>	<i>aacA-aphD</i>	<i>qac</i>	<i>smr</i>
A	<i>S. aureus</i> (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SCN (36)	80,5	47,2	-	8,3	8,3	61,1	44,4	66,6	63,8	-	66,6
B	<i>S. aureus</i> (1)	100	100	-	-	-	100	-	100	-	-	-
	SCN (48)	68,8	87,5	-	-	-	62,5	31,3	47,9	47,9	-	70,8
C	<i>S. aureus</i> (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SCN (27)	48,1	74	14,8	14,8	-	37	41	74	29,6	3,7	63
D	<i>S. aureus</i> (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SCN (35)	82,8	80	-	-	-	48,6	45,7	40	54,3	-	80
E	<i>S. aureus</i> (1)	100	-	-	-	-	100	-	-	100	-	100
	SCN (25)	64	88	-	-	-	96	68	60	64	-	96
F	<i>S. aureus</i> (13)	100	46,2	-	-	-	23	15,4	46,2	47	7,7	46,2
	SCN (26)	69,2	61,5	-	-	7,7	26,9	19,2	46,2	57,7	15,4	38,5
G	<i>S. aureus</i> (4)	25	50	-	-	-	50	75	75	25	-	75
	SCN (30)	26,7	76,7	3,3	3,3	-	83,4	76,7	63,4	23,4	-	80
Total	<i>S. aureus</i> (19)	84,2	47,4	-	-	-	36,8	26,3	56,6	47,4	5,3	52,6
	SCN (227)	64,3	74	1,8	3,5	1,3	59,5	45,4	56	44,5	5,7	70,9

Os dados referentes à correlação entre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a detecção de marcadores genéticos de resistência são apresentados nas tabelas 7 e 8.

De maneira geral, considerando-se os  $\beta$ -lactâmicos avaliados neste estudo, das 227 linhagens de SCN testadas, 78,5 % e 76,2 % apresentaram um fenótipo de resistência à penicilina e oxacilina, respectivamente. Dentre estes microrganismos resistentes, 73,1 % das amostras foram *mecA*<sup>+</sup> e 59,5 % *blaZ*<sup>+</sup>. Tais marcadores foram detectados também em 4,8 % (*blaZ*) e 8,4 % (*mecA*) das amostras que foram sensíveis aos respectivos antimicrobianos. Ainda neste contexto, em relação às 19 linhagens de *S. aureus* recuperadas, 89,5 % das amostras apresentaram fenótipo de resistência à penicilina e 84,5 % apresentaram o marcador *blaZ*. A resistência à oxacilina foi observada em 42,1 % dos isolados bacterianos e 31,6 % apresentaram o marcador genético *mecA*. O marcador *mecA* foi encontrado ainda em 15,8 % das amostras de *S. aureus* sensíveis à oxacilina.

O marcador genético que confere informação de resistência aos aminoglicosídeos avaliado neste estudo foi o *aacA-aphD*, e este foi detectado em 10,5 % das linhagens de *S. aureus* e 18,5 % das linhagens de SCN resistentes à gentamicina (21,4 % e 47,1 %, respectivamente). Este marcador também foi detectado também em 36,8 % (*S. aureus*) e 4,8 % (SCN) das amostras que foram sensíveis à gentamicina.

Em relação aos macrolídeos, 42,1 % e 56 % das linhagens de *S. aureus* apresentaram fenótipo de resistência e resistência intermediária à eritromicina, respectivamente, e apenas o marcador genético *msrA* foi detectado em 10,5 % dos isolados resistentes, e em 21 % dos isolados que apresentaram resistência intermediária. Detectou-se o marcador *msrB* nas amostras de *S. aureus* sensíveis à azitromicina (5,3 %) e à eritromicina (5,3). Este mesmo marcador também foi encontrado em 26,3 % das amostras com resistência intermediária à eritromicina. Quanto às amostras de SCN, observou-se 14,5 % e 67,8 % de resistência à azitromicina e eritromicina, respectivamente, bem como 9 % e 22,4 % de resistência intermediária aos mesmos antimicrobianos. Ainda referente a estas amostras, o marcador genético *msrA* foi detectado em 6,2 5 e 5,3 % das linhagens resistentes e com resistência intermediária, respectivamente, em relação à azitromicina. Quanto à eritromicina, o referido marcador também foi detectado em 38,8 % e 13,2 % das

linhagens resistentes e com resistência intermediária. Já em relação ao marcador *msrB*, a detecção ocorreu em 7 % e 26,9 % das amostras resistentes à azitromicina e eritromicina, respectivamente, bem como em 4 % e 11,5 % das linhagens com resistência intermediária aos respectivos antimicrobianos. Os marcadores *msrA* e *msrB* foram encontrados ainda nas amostras de SCN sensíveis à azitromicina (20,7 % para *msrA* e 34 % para *msrB*) e eritromicina (7,5 % para *msrA* e 7 % para *msrB*).

Considerando a resistência à clindamicina, entre as amostras de *S. aureus*, o marcador *linA* foi detectado apenas nas linhagens sensíveis (47,4 %). Em relação às linhagens isoladas de SCN, detectou-se o marcador *linA* em 19,4 % das amostras resistentes e em 11,5 % das amostras com resistência intermediária. O mesmo marcador foi detectado em 25,5 % das amostras sensíveis à clindamicina.

Os marcadores genéticos *ermA*, *ermB* e *ermC*, que conferem informação de resistência aos macrolídeos, lincosalinas e estreptograminas não foram detectados entre as amostras bacterianas identificadas como *S. aureus*. Considerando os isolados de SCN, estes marcadores foram detectados em índices inferiores a 2 % nas amostras resistentes, com resistência intermediária e sensíveis à azitromicina, eritromicina e clindamicina.

**Tabela 7.** Correlação entre o perfil de susceptibilidade e a presença dos respectivos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos das 227 linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo* isoladas a partir das 7 marcas comerciais diferentes de queijo Minas Frescal (no total de 35 amostras de queijo), considerando-se os genes de resistência aos antimicrobianos avaliados.

Antimicrobiano utilizado	Perfil de susceptibilidade e presença de gene de resistência aos antimicrobianos (considerando as 227 linhagens de SCN isoladas de QMF)						
	% R (n)	% RI (n)	% S (n)	Gene detectado (n)	% R + gene (n)	% RI + gene (n)	% S + gene (n)
PEN	78,5 (178)	7,7 (18)	13,7 (31)	<i>blaZ</i> (146)	59,5 (135)	-	4,8 (11)
OXA	76,2 (173)	-	23,8 (54)	<i>mecA</i> (185)	73,1 (166)	-	8,4 (19)
AZI	14,5 (33)	9 (21)	76,2 (173)	<i>msrA</i> (135)	6,2 (14)	5,3 (12)	47,1 (107)
				<i>msrB</i> (103)	7 (16)	4 (9)	33 (75)
				<i>ermA</i> (4)	0,4 (1)	-	1,3 (3)
				<i>ermB</i> (4)	-	0,9 (2)	0,4 (1)
				<i>ermC</i> (3)	-	-	1,3 (3)
ERY	67,8 (154)	22,4 (51)	9,7 (22)	<i>msrA</i> (135)	38,8 (88)	13,2 (30)	7,5 (17)
				<i>msrB</i> (103)	26,9 (61)	11,5 (26)	7 (16)
				<i>ermA</i> (4)	1,8 (4)	-	-
				<i>ermB</i> (4)	1,3 (3)	-	-
				<i>ermC</i> (4)	0,4 (1)	0,9 (2)	-
GEN	47,1 (107)	31,6 (72)	21,1 (48)	<i>aacA-aphD</i> (102)	18,9 (43)	21,1 (48)	4,8 (11)
CLI	37,7 (81)	20,1 (46)	44 (100)	<i>linA</i> (128)	19,4 (44)	11,5 (26)	25,5 (58)
				<i>ermA</i> (4)	0,9 (2)	-	0,9 (2)
				<i>ermB</i> (4)	0,9 (2)	-	0,4 (1)
				<i>ermC</i> (3)	-	-	1,3 (3)

PEN: penicilinA, OXA: oxacilinA, AZI: azitromicina, ERY: eritromicina, GEN: gentamicina, CLI: clindamicina, % R: percentual de resistência, % RI: percentual de resistência intermediária, % S: percentual sensibilidade, % R + gene: percentual de resistência associado à presença de gene que confere informação de resistência, % RI + gene: percentual resistência intermediária associado à presença de gene que confere informação de resistência, % S + gene: percentual de sensibilidade associado à presença de gene que confere informação de resistência

**Tabela 8.** Correlação entre o perfil de susceptibilidade e a presença dos respectivos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos das 19 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir das 7 marcas comerciais diferentes de queijo Minas Frescal (no total de 35 amostras de queijo), considerando-se os genes de resistência aos antimicrobianos avaliados.

Antimicrobiano utilizado	Perfil de susceptibilidade e presença de gene de resistência aos antimicrobianos (considerando as 19 linhagens de <i>S. aureus</i> isoladas de QMF)						
	% R (n)	% RI (n)	% S (n)	Gene detectado (n)	% R + gene (n)	% RI + gene	% S + gene (n)
PEN	89,5 (17)	-	10,5 (2)	<i>blaZ</i> (16)	84,2 (16)	-	-
OXA	42,1 (8)	-	57,9 (11)	<i>mecA</i> (9)	31,6 (6)	-	15,8 (3)
AZI	-	-	19 (100)	<i>msrA</i> (7)	-	-	-
				<i>msrB</i> (5)	-	-	5,3 (1)
ERY	42,1 (8)	56,2 (10)	5,3 (1)	<i>msrA</i> (7)	10,5 (2)	26,3 (5)	-
				<i>msrB</i> (5)	-	21 (4)	5,3 (1)
GEN	21 (4)	21 (4)	58 (11)	<i>aacA-aphD</i> (9)	10,5 (2)	-	36,8 (8)
CLI	5,3 (1)	10,6 (2)	84,2 (16)	<i>linA</i> (10)	-	5,3 (1)	47,4 (9)

PEN: penicilina, OXA: oxacilina, AZI: azitromicina, ERY: eritromicina, GEN: gentamicina, CLI: clindamicina, % R: percentual resistência, % RI: percentual resistência intermediária, % S: percentual de sensibilidade, % R + gene: percentual de resistência associado à presença de gene que confere informação de resistência, % RI + gene: percentual de resistência intermediária associado à presença de gene que confere informação de resistência, % S + gene: percentual de sensibilidade associado à presença de gene que confere informação de resistência.

Considerando-se o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a distribuição de marcadores genéticos de resistência (tabelas 9A-G), não foram observadas amostras bacterianas sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Aproximadamente 2 % das amostras bacterianas recuperadas se mostraram resistentes a apenas um antimicrobiano e, em todos estes casos, o antimicrobiano foi a eritromicina. Na maioria das bactérias pertencentes a este grupo (80 %), observou-se a presença de marcadores genéticos que codificam informação de resistência para outros grupos de antimicrobiano, além dos macrolídeos.

Ainda em relação às tabelas 9A-G e 10, observa-se a presença da associação dos marcadores *mecA* e *blaZ* em 48 % de todos os isolados. Deste total, apenas 6 % não apresentaram fenótipo de resistência associado à penicilina e/ou oxacilina. Uma outra associação representativa de marcadores de resistência observada foi referente a *msrA* e *msrB*, presente em 38 % dos isolados. Neste caso, observou-se também um pequeno percentual (7,5 %) de amostras bacterianas que não apresentaram fenótipo de resistência aos macrolídeos.

Uma associação que também pode ser notada a partir das tabelas a seguir é referente aos marcadores genéticos *mecA*, *blaZ*, *msrA*, *msrB*, *linA*, *aacA-aphD*, que está relacionada à 5,7 % das amostras de SCN testadas. Em todas as 13 linhagens, a partir das quais tal associação dos genes foi detectada, o perfil de susceptibilidade apresenta resistência pelo menos a oxacilina, penicilina, eritromicina, azitromicina e gentamicina. O marcador genético *aacA-aphD* foi detectado em 41 % dos isolados bacterianos avaliados, e nestes casos aproximadamente 83 % e 86 % das amostras apresentavam resistência fenotípica à gentamicina e a oxacilina, respectivamente.

Quanto ao grupo das linezolidas, a relação positiva entre fenótipo e genótipo de resistência foi observada em aproximadamente 38 % dos isolados bacterianos.

Em relação aos marcadores que conferem informação de resistência aos biocidas, o gene *smr* foi detectado em 63,4 % de todos os isolados bacterianos estudados, bem como a associação do gene *smr* e *qac* foi confirmada em aproximadamente 5 % das amostras.

**Tabela 9A.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 36 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal A.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (N)	Genótipo	Frequência % (n)
A (36)	ERY (1)	<i>mecA, blaZ, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	PEN-OXA-ERY (3)	<i>BlaZ</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	2,8 (1)
	SXT-CLI-ERY (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	PEN-OXA-CLI-ERY (1)	<i>mecA, blaZ, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERY (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	PEN-OXA-SXT-CLI-ERY (3)	<i>blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
		<i>blaZ, aacA-aphD</i>	5,6 (2)
	GEN-PEN-OXA-ERY-RIF (1)	<i>blaZ, aacA-aphD, sem</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-RIF (2)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD, smr</i>	5,6 (2)
	TET-GEN-PEN-OXA-ERY (1)	<i>mecA, blaZ, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERY (5)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERY (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	5,6 (2)
		<i>msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERY-AZI-RIF (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERY-AZI (2)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD,</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERY-RIF (3)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERY-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-ERY-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, ermB, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-ERY-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, ermB, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI-RIF (3)	<i>msrA, msrB, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
		<i>blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERY-RIF (2)	<i>mecA, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERY: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 9B.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 48 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal B.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)	
B (48)	SXT-ERI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,1 (1)	
	SXT-CLI-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	2,1 (1)	
	PEN-SXT-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, qac, smr</i>	2,1 (1)	
	GEN-PEN-OXA-ERI (3)	<i>mecA, blaZ, msrB, qac, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrB, linA, aacA-aphD</i>	2,1 (1)	
	PEN-OXA-ERI-AZI	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, qac, smr</i>	2,1 (1)	
	TET-SXT-CLI-ERI-AZI (2)	<i>mecA, blaZ, msrA</i>	2,1 (1)	
	LEV-GEN-PEN-OXA-ERI (2)	<i>mecA, blaZ, linA, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, qac, smr</i>	2,1 (1)	
	TET-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>mecA, msrA, linA, qac, smr</i>	2,1 (1)	
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (11)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, linA, aacA-aphD</i>	4,2 (2)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, smr</i>	4,2 (2)	
		<i>mecA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	2,1 (1)	
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, qac, smr</i>	2,1 (1)	
		GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, qac, smr</i>	2,1 (1)
		TET-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (2)	<i>aacA-aphD</i>	2,1 (1)
		<i>aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)	
	LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	2,1 (1)	
TET-GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (1)	<i>mecA, linA, aacA-aphD</i>	2,1 (1)		
TET-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	2,1 (1)		
LEVO-GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, qac, smr</i>	2,1 (1)		
GEN-PEN-OXA-SXT-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, qac, smr</i>	2,1 (1)		
GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (7)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD</i>	2,1 (1)		
	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)		

	<i>mecA, blaZ, msrA, aacA-aphD</i>	4,2 (2)
	<i>mecA, blaZ aacA-aphD</i>	2,1 (1)
	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	4,2 (2)
GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,1 (1)
GEN-PEN-OXA-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD</i>	2,1 (1)
GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-RIF (4)	<i>aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)
	<i>mecA, linA, aacA-aphD, smr</i>	4,2 (2)
	<i>linA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)
TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB</i>	2,1 (1)
TET-GEN-PEN-OXASXT-CLI-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)
TET-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	2,1 (1)
TET-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)
LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,1 (1)

---

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: SXTfametoxazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolid, RIF: rifamicina

**Tabela 9C.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 27 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal C.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)
C (27)	GEN-PEN-OXA-RIF (1)	<i>blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, linA, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (2)	-	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrB, linA, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (3)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	7,4 (2)
		<i>blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-RIF (1)	<i>mecA, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-AZI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)
	PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (2)	<i>mecA, linA, qac, smr</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, linA</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (4)	<i>mecA, msrA, smr</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, smr</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, linA</i>	3,7 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-ERI-AZI (2)	<i>mecA, linA</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, ermA, linA</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (2)	<i>ermA, linA</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, ermA, linA</i>	3,7 (1)
	PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, ermA, smr</i>	3,7 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (4)	<i>mecA, blaZ, linA</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, linA, smr</i>	3,7 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrB, linA</i>	3,7 (1)
		<i>linA, smr</i>	3,7 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (1)	<i>linA</i>	3,7 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,7 (1)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilinA, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 9D.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 35 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal D.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)
D (35)	ERI (2)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	CLI-ERI (1)	<i>aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	SXT-ERI (1)	<i>mecA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	LEVO-SXT.CLI-ERI (1)	<i>blaZ, smr</i>	2,8 (1)
	LEVO-GEN-SXT-ERI (2)	<i>mecA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>blaZ, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	TET-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (2)	<i>blaZ, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>mecA, ermC, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (3)	<i>mecA, blaZ, msrB, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, ermA, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI-AZI-RIF (3)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	5,7 (2)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (5)	<i>mecA, msrA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)
	PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	2,8 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	2,8 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	2,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	2,8 (1)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 9E.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 25 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal E.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)
E (25)	LEVO-ERI (1)	<i>aacA-aphD</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA (3)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI (1)	<i>mecA, msrA, linA, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-RIF (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	8 (2)
	GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (3)	<i>mecA, msrA, msrB, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (8)	<i>msrA, msrB, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, msrA, aacA-aphD, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	8 (2)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	4 (1)
		<i>blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	8 (2)
		<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-RIF (3)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	4 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	4 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	4 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-RIF (1)	<i>mecA, msrA, smr</i>	4 (1)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacim, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 9F.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 26 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal F.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)
F (26)	ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-SXT-ERI (1)	-	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA (2)	<i>mecA, blaZ, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
		<i>blaZ, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	TET-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	3,8 (1)
	PEN-OXA-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrB, linA, smr</i>	3,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-RIF (1)	<i>blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	TET-SXT-CLI-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, linA, smr</i>	3,8 (1)
	TET-PEN-OXA-SXT-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (1)	<i>aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (2)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	7,7 (2)
	CLO-PEN-OXA-SXT-ERI-RIF (1)	<i>mecA, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, qac, smr</i>	3,8 (1)
	GEN-PEN-OXA-SXT-ERI-RIF (1)	<i>mecA, blaZ, linA, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI-AZI (1)	<i>aacA-aphD, qac</i>	3,8 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI (2)	<i>mecA, linA, aacA-aphD</i>	3,8 (1)
		<i>mecA, smr</i>	3,8 (1)
	TET-LEVO-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI-RIF (2)	<i>mecA, ermC, aacA-aphD</i>	7,7 (2)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacim, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 9G.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo*, considerando os 30 isolados bacterianos recuperados da marca de queijo Minas Frescal G.

Marca do QMF (n)	Fenótipo de Resistência (n)	Genótipo	Frequência % (n)
G (30)	ERI (1)	<i>linA</i>	3,3 (1)
	ERI-AZI (1)	<i>linA</i>	3,3 (1)
	CLI-AZI (1)	<i>linA</i>	3,3 (1)
	PEN-OXA-ERI (1)	<i>msrA, msrB, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN-OXA (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-CLI-ERI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
	LEVO-GEN-PEN-ERI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI (7)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
		<i>msrA, msrB, smr</i>	6,7 (2)
		<i>msrA, msrB</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, msrA, linA, smr</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN- OXA-AZI (1)	<i>mecA</i>	3,3 (1)
	PEN-OXA-ERI-RIF (1)	<i>mecA</i>	3,3 (1)
	TET-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, ermA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI-RIF (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, linA</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (5)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, smr</i>	6,7 (2)
		<i>mecA, msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
		<i>msrA, msrB, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
		<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
	GEN-PEN-OXA-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
	LEVO-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	3,3 (1)
	CLO-TET-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, ermB, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)
CLO-TET-GEN-PEN-OXA-ERI-AZI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)	
GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, smr</i>	3,3 (1)	
GEN-PEN-OXA-SXT-CLI-ERI-AZI-RIF (1)	<i>mecA, msrA, msrB, smr</i>	3,3 (1)	

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolida, RIF: rifamicina

**Tabela 10.** Correlação entre a distribuição dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos e aos biocidas e o fenótipo de resistência aos antimicrobianos entre as 19 linhagens de *Staphylococcus aureus* recuperadas das 35 amostras de queijo Minas Frescal avaliadas.

Fenótipo de Resistência (N)	Genótipo	Frequência % (n)
PEN-ERI (2)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	10,5 (2)
CLI-ERI (1)	<i>linA</i>	5,2 (1)
PEN-SXT-ERI (3)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	10,5 (2)
	<i>blaZ, linA, aacA-aphD</i>	5,2 (1)
LEVO-PEN-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD,</i>	5,2 (1)
PEN-OXA-ERI (1)	<i>blaZ, msrB, linA, qac, smr</i>	5,2 (1)
PEN-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, linA, smr</i>	5,2 (1)
PEN-SXT-CLI-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	5,2 (1)
LEVO-PEN-SXT-ERI (1)	<i>blaZ, aacA-aphD</i>	5,2 (1)
TET-PEN-SXT-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	5,2 (1)
GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrA, linA</i>	5,2 (1)
LEVO-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, blaZ, msrB, linA, smr</i>	5,2 (1)
CLO-TET-GEN-PEN-OXA (1)	<i>blaZ, msrB, smr</i>	5,2 (1)
TET-GEN-PEN-OXA-SXT-ERI (2)	<i>mecA, blaZ, msrA, smr</i>	5,2 (1)
	<i>mecA, blaZ, msrA, linA, smr</i>	5,2 (1)
CLO-TET-GEN-PEN-OXA-ERI (1)	<i>mecA, msrA, msrB, linA, aacA-aphD, smr</i>	5,2 (1)
TET-GEN-PEN-OXA-CLI-ERI (1)	<i>blaZ, msrA, aacA-aphD, smr</i>	5,2 (1)

Legenda: CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina, LEVO: levofloxacin, GEN: Gentamicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilinA, SXT: SXTfametoazol-trimetoprim, CLI: Clindamicina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, LIN: linezolid, RIF: rifamicina

O índice multirresistência aos antimicrobianos (MAR) de SCN e *S. aureus* resistentes é mostrado nas tabelas 11 e 12 a seguir. Com base neste parâmetro, 80,6 % dos isolados de SCN e 84,2 % dos isolados de *S. aureus* foram classificados como microrganismos multirresistentes, com um índice MAR > 0,2. Considerando apenas as bactérias que pertencem à mesma marca de QMF avaliada, o percentual de isolados com índice MAR > 0,2 variou de 50 % a 92,6 % para SCN e de 50 % a 100 % para *S. aureus*.

#### **5.4. Avaliação das características fisiológicas e moleculares associadas à virulência.**

Considerando-se a atividade hemolítica,  $\alpha$  e  $\beta$ -hemólise foram observadas em 3 % e 5,3 % das amostras de SCN identificadas, respectivamente (tabela 11). A  $\beta$ -hemólise também foi encontrada nas linhagens de *S. aureus*, com um percentual de 36,8 %. Neste grupo de microrganismo, não foi observada  $\alpha$ -hemólise (tabela 12).

As 227 bactérias SCN e 19 *S. aureus* também foram testadas quanto à presença de genes das enterotoxinas A-D, bem como a capacidade de produção de biofilme. Observou-se que três amostras de SCN apresentavam o gene para a produção de enterotoxina A, e nenhum gene foi encontrado entre as amostras de *S. aureus*. A capacidade de produção de biofilme foi detectada em 30 % e 36,8 % das amostras de SCN e *S. aureus*, respectivamente (tabelas 11 e 12).

**Tabela 11.** Associação entre as características fisiológicas e moleculares de resistência à oxacilina, multirresistência, biofilme e atividade hemolítica entre as amostras de *Staphylococcus coagulase negativo* recuperadas a partir das amostras de queijo Minas Frescal.

Marca do queijo	Número de isolados de SCN	SCN <i>mecA</i> <sup>+</sup> n (%)	Resistência à oxacilina n (%)	Índice MAR > 0,2 n (%)	Produção de Biofilme n (%)	Atividade hemolítica n (%)	
						α	β
1	36	28 (77,8)	31 (86,1)	32 (89)	5 (13,9)	1 (2,8)	1 (2,8)
2	48	42 (87,5)	38 (79,2)	43 (89,6)	7 (14,6)	4 (8,3)	1 (2,1)
3	27	19 (70,4)	24 (88,8)	25 (92,6)	7 (25,9)	-	-
4	35	28 (80,0)	25 (71,4)	25 (71,4)	7 (20,0)	1 (2,8)	1 (2,8)
5	25	21 (84,0)	23 (92)	22 (88)	13 (52)	-	1 (4)
6	26	19 (73,0)	11 (42,3)	13 (50)	13 (50)	1 (3,8)	7 (26,9)
7	30	28 (93,3)	21 (70)	23 (76,7)	16 (53,3)	-	1 (3,3)
Total	227	185 (81,5)	173 (76,2)	183 (80,6)	68 (30)	7 (3)	12 (5,3)

**Tabela 12.** Associação entre as características fisiológicas e moleculares de resistência à oxacilina, multirresistência, biofilme e atividade hemolítica entre as amostras de *Staphylococcus aureus* recuperadas a partir das amostras de queijo Minas Frescal.

Marca do queijo	Número de isolados de <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> <i>mecA</i> <sup>+</sup> n (%)	Resistência à oxacilina n (%)	Índice MAR > 0,2 n (%)	Produção de Biofilme n (%)	Atividade hemolítica n (%)	
						α	β
2	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	-	-	-
5	1	-	1 (100)	1 (100)	-	-	-
6	13	6 (46,2)	4 (30,8)	12 (92,3)	5 (38,5)	-	5 (38,5)
7	4	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (28,6)	-	2 (50)
Total	19	9 (47,4)	8 (42,1)	16 (84,2)	7 (36,8)	-	7 (36,8)

## 6. DISCUSSÃO

A contaminação microbiana na indústria de alimentos faz com que o consumidor fique exposto a sérios riscos relacionados à saúde. Neste contexto, as indústrias de laticínios são consideradas particularmente susceptíveis à contaminação por microrganismos, principalmente pela matéria prima utilizada na fabricação e pelo elevado teor de umidade encontrado nos locais de produção (PERRY, 2004).

De acordo com a literatura, a contaminação microbiana do queijo Minas Frescal (QMF) está associada às falhas que podem ocorrer em qualquer etapa na linha de produção do alimento, tais como as condições sanitárias dos rebanhos, que afetam diretamente na qualidade da matéria prima utilizada, até o transporte e comercialização dos queijos, em que o tempo e a temperatura de conservação durante o armazenamento podem explicar os percentuais elevados de amostras impróprias para consumo humano (BRANT et al., 2007).

Atualmente, a autoridade sanitária brasileira, representada pela ANVISA, apresenta limites para as contagens de *Staphylococcus aureus* encontrados em alimentos como o QMF, mas ainda não existe nenhuma legislação específica referente à contagem de *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN). Contudo, apesar de não serem previstas pela legislação vigente, as contagens elevadas de SCN encontradas no presente estudo (gráfico 1) podem representar a má qualidade do produto. Torna-se relevante destacar que, das quatro marcas de QMF positivas com relação à presença de *S. aureus*, uma apresentou contagens de *S. aureus* em torno de  $10^3$  UFC/g e as outras três marcas apresentaram contagens acima do valor permitido por lei para este tipo de alimento (BRASIL, 2001). Em relação às linhagens de SCN recuperadas, as contagens se mostraram elevadas nas 35 amostras de queijo testadas, com variação entre  $1,1 \times 10^5$  a  $9,2 \times 10^7$  UFC/g. A partir dos dados obtidos, observa-se também que todas as amostras de QMF avaliadas apresentaram contagens de SCN superiores a  $10^3$  UFC/g, que é o padrão estabelecido por lei para a presença de *Staphylococcus aureus* neste tipo de queijo.

Considerando os microrganismos previstos na legislação como contaminantes (Anexo B), alguns autores relatam a contaminação dos produtos em 100% do QMF amostrado, com contagens microbianas acima do permitido por lei, especialmente em queijos artesanais, cujo leite usado como matéria prima não sofre processo de controle da população microbiana, tal como a pasteurização (LUBECK et al., 2001; PINTO et al., 2011). Em um trabalho mais semelhante ao presente estudo, com uma avaliação de queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, Rocha et al. (2006) observaram que 85,7 % das amostras de QMF industrializado estavam impróprias para consumo, apresentando índices que variam de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/g de *Staphylococcus* spp. Tais autores consideram o QMF um alimento muito susceptível à contaminação microbiana e, por isso, esse processo pode ocorrer já a partir da matéria prima contaminada. No entanto, os mesmos autores sugerem também que o índice elevado de microrganismos nos queijos fabricados a partir de leite pasteurizado pode estar associado a contaminações cruzadas durante ou após o processamento do alimento.

Em relação ao presente estudo, em todas as 35 amostras de QMF avaliadas, o leite utilizado como matéria prima na fabricação do queijo era descrito como pasteurizado, e as embalagens apresentavam o selo do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.), que garante a obrigatoriedade da utilização do leite pasteurizado na fabricação de queijos. Entretanto, uma vez que a fiscalização das amostras comercializadas não é constante, torna-se muito difícil garantir aos consumidores um produto dentro dos padrões de qualidade e adequado para o consumo (OLIVEIRA et al., 2003). Assim, considerando-se as técnicas microbiológicas utilizadas e o controle de qualidade experimental, as questões sanitárias envolvendo a cadeia produtiva das diferentes amostras de QMF avaliadas, poderiam explicar os índices tão elevados de microrganismos recuperados no presente trabalho. Além disso, Okura e Moacir (2010) sugerem, a partir de seus estudos onde os resultados de amostras de QMF com SIF apresentaram índices de contaminação bacteriana elevada, que apenas a aplicação da pasteurização parece não resolver completamente o problema da qualidade dos queijos, apontando uma necessidade de investimento na melhoria das instalações, higienização adequada e monitorada dos equipamentos e utensílios, bem como investimento em capacitação de

funcionários nas empresas com Serviço implantado de inspeção sanitária (SIF). A ocorrência de altos níveis populacionais destes microrganismos no queijo, segundo Assumpção et al. (2003), pode resultar, ainda, em uma diminuição na vida útil do alimento, acarretando em prejuízos financeiros, além dos riscos à saúde do consumidor.

Em relação aos SCN, além da contagem excessiva destes microrganismos nas amostras de QMF avaliadas neste estudo, é importante destacar que, recentemente, tais microrganismos vêm surgindo como patógenos oportunistas significativos, tanto na medicina humana quanto veterinária (ROHDE et al., 2004; PIETTE e VERSCHRAEGEN, 2009). Estas bactérias podem se dispersar inicialmente a partir de animais, em decorrência de existirem normalmente como componentes da microbiota residente nas membranas mucosas e pele de muitos animais (SAWANT et al., 2009; CONTON et al., 2010). Até alguns anos atrás, na indústria de alimentos, SCN eram considerados como contaminantes que não apresentavam riscos à saúde dos consumidores. No entanto, a descoberta de que linhagens de SCN também podem produzir enterotoxinas exigiu que a importância destes microrganismos fosse reconsiderada, e seu significado na saúde pública se tornou uma preocupação em todo o mundo (OLIVEIRA et al., 2010, RALL et al., 2010).

Além do exposto, a detecção de contagens elevadas de bactérias do gênero *Staphylococcus* em todas as marcas de QMF avaliadas neste estudo é de grande interesse, especialmente considerando os níveis de resistência aos antimicrobianos e características de virulência exibidos por tais isolados. Estes achados sugerem que tais produtos podem ser considerados como um importante reservatório para patógenos oportunistas com multirresistência aos antimicrobianos, uma vez que já foi demonstrado para *S. aureus* e sugerido para SCN (PEREIRA et al., 2009; PODKOWIK et al., 2012).

Quanto às principais características de virulência associadas ao gênero *Staphylococcus*, embora existam poucos relatos na literatura para comparar com os presentes resultados, a frequência elevada de isolados produtores de biofilme a partir do QMF industrializado pode representar riscos associados não apenas à relação bactéria-hospedeiro, mas também à persistência bacteriana em toda a cadeia de produção do alimento. Acredita-se que as bactérias possam permanecer

nos biofilmes, em virtude de sua capacidade de aderência à superfície e resistência aos fatores físicos, químicos e biológicos, tais como calor, desidratação, detergentes, biocidas e antimicrobianos (SIMOJOKI et al., 2012). Adicionalmente, a ocorrência de bactérias hemolíticas e daquelas que carregam genes de enterotoxinas, incluindo o gene de enterotoxina A estafilocócica, representam preocupações acerca das relações bactéria-hospedeiro. Entretanto, uma importante preocupação é que a presença de um gene *de* que codifica para uma enterotoxina não indica que a enterotoxina em questão é expressa e está presente no alimento. Entre as enterotoxinas estafilocócicas, as enterotoxinas A e B são as mais prevalentes em casos de intoxicação alimentar. Veras et al., (2008) avaliaram o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. no Brasil, nesse contexto, e observaram que 38 % das linhagens avaliadas, isoladas de surtos de intoxicação alimentar, carregavam os genes de enterotoxinas A, B e C. A observação no presente estudo de três isolados bacterianos contendo o gene *sea*, que confere informação de produção de enterotoxina A, é preocupante, principalmente por que estes microrganismos estavam presentes nos queijos em quantidades (UFC/g) acima do permitido pela legislação, tornado *per se* o alimento uma potencial fonte de microrganismos associados à toxinfecção alimentar.

Além dos fatores de virulência bacterianos clássicos, a resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se mostrado um problema crescente em relação à virulência bacteriana, à medida que é um fenômeno que se origina em resposta ao estresse causado por tais fármacos, tendo como principal consequência a diminuição no efeito da quimioterapia, interferência no diagnóstico microbiológico e provável aumento na morbidade das doenças infecciosas. Nesse contexto, as bactérias do gênero *Staphylococcus* têm se destacado por apresentarem, ao longo dos anos, uma capacidade notável de se tornarem resistentes aos agentes antimicrobianos (TAVARES, 2000; MALLORQUI-FERNANDEZ et al., 2004; WEESE e DUIJKEREN, 2010).

A utilização de antimicrobianos como aditivos de ração representam, atualmente, uma das maiores preocupações relacionadas às bactérias associadas a alimento resistentes aos antimicrobianos (SORUM e L'ABÉE-LUND, 2002). Além disso, já foi descrito a possibilidade de transferência de bactérias do gênero

*Staphylococcus* entre hospedeiros como o gado e o ser humano. E, embora tais eventos não sejam descritos com muita frequência, considera-se possível que infecções em humanos ocorram por meio da ingestão de alimentos contaminados com *Staphylococcus* que apresentam resistência aos antimicrobianos (LEE, 2003)

Os  $\beta$ -lactâmicos são considerados importantes agentes antimicrobianos utilizados no tratamento e prevenção de doenças em humanos e em outros animais. A resistência à penicilina, bem como outros antimicrobianos pertencentes ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos está relacionada à produção de  $\beta$ -lactamases e também à produção de proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade, a PBP2a (SAWANT et al., 2009; DOYLE et al., 2012). O percentual elevado de linhagens bacterianas do gênero *Staphylococcus* resistentes à penicilina, 89,5 % para *S. aureus* e 78,5 % para SCN, recuperadas neste estudo é similar aos resultados apresentados por Yucel, Citak & Bayhün (2011). Segundo estes autores, tais resultados não surpreendem em virtude da penicilina ser um dos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções tanto em humanos quanto em animais.

A resistência à oxacilina, encontrada nas amostras de queijo avaliadas neste estudo, é um fenômeno preocupante, principalmente pelo percentual elevado de amostras apresentando tal fenótipo. Perreten et al. (1998) e Normanno et al. (2007) sugeriram que a pasteurização do leite pode eliminar os riscos dos consumidores adquirirem infecções relacionadas aos *Staphylococcus* resistentes à metilicina ou oxacilina. Entretanto, no presente estudo, verificou-se que o leite utilizado na fabricação de todos os queijos avaliados era pasteurizado, em concordância com o controle de qualidade das indústrias de alimento. Apesar deste tipo de tratamento, linhagens de bactérias do gênero *Staphylococcus* foram isoladas de todas as marcas de QMF avaliadas e o gene que confere resistência a tais antimicrobianos foi detectado em 81,5 % dos SCN e 47,4 % dos *Staphylococcus aureus* recuperados neste estudo. Alguns autores afirmam ainda que as linhagens de bactérias do gênero *Staphylococcus* resistentes à metilicina ou à oxacilina podem ser resistentes a muitas outras classes de antimicrobianos (CHAMBERS, 1997; SAWANT et al., 2009).

A atividade antibacteriana da gentamicina, tetraciclina, fluoroquinolona e cloranfenicol também foi testada para todas as linhagens bacterianas recuperadas.

Observou-se fenótipo de resistência em todos estes grupos de antimicrobianos em relação aos isolados de SCN e *S. aureus* neste estudo. As frequências de resistência à fluoroquinolona e cloranfenicol observadas estão de acordo com aquelas relatadas em outros estudos realizados com *Staphylococcus spp.* isolados de alimentos (PODKOWIK et al., 2012; RESCH et al., 2008).

A resistência ao aminoglicosídeo avaliado é preocupante, em decorrência do uso controlado deste agente antimicrobiano no tratamento de doenças humanas e animais (SORUM e L'ABÉE-LUND 2002; KUMAR et al., 2011). Outros autores também relataram frequências de resistência à tetraciclina entre isolados de bactérias do gênero *Staphylococcus* similares às aquelas observadas no presente estudo. O uso comum deste antimicrobiano tanto na medicina humana quanto animal, além da utilização como promotores de crescimento animal, pode explicar a ocorrência de *S. aureus* e SCN resistentes em amostras de queijo (TEUBER, 2001; RESCH et al., 2008).

No presente estudo, em relação aos macrolídeos, apesar da utilização frequente de azitromicina para o tratamento da mastite bovina associada a bactérias do gênero *Staphylococcus* (LUCAS et al., 2010), os resultados demonstraram um número elevado de isolados bacterianos sensíveis a este medicamento entre todas as amostras bacterianas avaliadas neste estudo, o que corrobora com a ideia de que a contaminação ocorreu após a pasteurização do leite em qualquer etapa de produção dos queijos. Em relação à eritromicina, tal antimicrobiano exibiu percentuais elevados de resistência, tanto para as amostras de SCN quanto para as amostras de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram descritos em estudos anteriores, envolvendo bactérias do gênero *Staphylococcus* a partir de várias fontes, incluindo animais e alimentos (GATERMANN et al., 2007; HUBER et al., 2011; BHARGAVA e ZHANG 2012; WANG et al., 2012).

Nos últimos anos, a utilização da vancomicina em humanos aumentou muito, embora nenhuma resistência à vancomicina tenha sido observada entre os 19 isolados *S. aureus* e os 227 isolados de SCN avaliados neste estudo. De maneira similar, não observamos resistência associada à linezolida. Estudos prévios indicam que estes antimicrobianos são considerados como medicamentos de reserva, em virtude de aumentar o risco de resistência bacteriana. Resultados recentes também

não relatam resistência à vancomicina em *Staphylococcus* spp. associados às amostras queijo e leite *in natura* (YUCEL, CITAK & BAYÜN, 2011; WANG et al., 2012). O surgimento da resistência à linezolida em isolados de *Staphylococcus* spp. representa desafios significativos no tratamento clínico de infecções causadas por estes organismos, especialmente no caso de SCN (FUNG et al., 2001; GU et al., 2012).

Considerando ainda a resistência bacteriana aos antimicrobianos, foi proposto um índice para determinação da resistência múltipla a drogas entre microrganismos isolados de ambiente, o —índice MAR (multirresistência aos antimicrobianos) (KRUMPERMAN, 1983). Tal índice pode ser considerado uma excelente ferramenta que permite analisar a disseminação de bactérias resistentes em uma determinada população. Dessa maneira, é possível avaliar se estas linhagens bacterianas podem ser consideradas potenciais fontes de dispersão de genes de resistência. Valores de  $MAR \geq 2$  são geralmente encontrados em ambientes onde a utilização de antimicrobianos é frequente. Dos dados obtidos no presente estudo, é importante destacar que tanto as linhagens de *S. aureus* quanto de SCN apresentaram índice  $MAR \geq 2$  em mais de 80 % dos isolados e são, portanto, consideradas bactérias multirresistentes.

Atualmente, uma outra questão referente aos problemas relacionados à multirresistência que tem sido proposta é que as espécies do gênero *Staphylococcus* da microbiota residente podem ser reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos, em virtude destas bactérias serem susceptíveis à pressão seletiva imposta tanto pela terapia antimicrobiana adequada quanto abusiva em humanos e animais (PHILLIPS et al., 2004; IRLINGER 2008). De acordo com Varga et al. (2012), os genes que codificam informação de resistência aos antimicrobianos podem estar presentes em elementos genéticos móveis, tal como os transposon, localizados tanto no cromossomo bacteriano quanto no DNA plasmidial. Além disso, foi descrito anteriormente que as amostras de SCN e de *S. aureus* associadas aos alimentos, e que também apresentam resistência aos antimicrobianos, podem ser transferidas ao homem por meio do consumo de alimentos. Tal transferência é possível por meio da presença de resíduos de

antibióticos no alimento e transferência de patógenos do alimento para o consumidor.

Adicionalmente, os determinantes de resistência aos antimicrobianos contidos nos microrganismos também podem ser transferidos para outras bactérias comensais potencialmente patogênicas nos alimentos, ideia esta que é sustentada por estudos de filogenética (LEE, 2003; BARBOSA et al., 2007; RESCH et al., 2008; PODKOWIK et al., 2012; RIZEK et al., 2011). Wang et al. (2006) consideram a cavidade oral uma região importante para o início de muitas interações entre microrganismos presentes no alimento e a microbiota residente, incluindo eventos de transferência horizontal de genes, que começam a ocorrer durante a retenção dos resíduos alimentares na boca. Esses autores concluíram em seus estudos que a microbiota residente de crianças e adultos pode se tornar resistente a antimicrobianos, mesmo na ausência de tratamento com antibióticos.

A detecção do gene *mecA* é considerada como o indicador padrão ouro para avaliar a resistência à meticilina/oxacilina (ANAND et al., 2009; JOHN et al., 2009, XU et al., 2012), uma penicilina resistente à penicilinase que atualmente vem sendo cada vez mais prescrita para tratar infecções estafilocócicas (ZHANG et al., 2009). Este gene está localizado em um elemento genético, determinado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que está inserido próximo à origem de replicação cromossomal e pode ser transmitido facilmente entre as bactérias do gênero *Staphylococcus* (SAWANT et al., 2009). Estes autores também mostraram que o gene *mecA* em SCN que foram isolados a partir do leite compartilham homologia de sequência com SCC*mec*, similar às sequências de gene observadas em *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) adquiridos na comunidade, indicando uma possível contaminação com microrganismos da microbiota humana. Em um outro estudo, Lee et al. (2003) confirmaram que as linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina presentes em animais eram genotipicamente idênticas às linhagens do mesmo microrganismo encontrado em humanos. Este fato sugere que tais bactérias podem ser disseminadas entre populações de diferentes hospedeiros, uma vez que a transmissão interespecie foi confirmada.

No presente estudo, o elevado percentual de SCN e *S. aureus* contendo o gene *mecA* foi consistente com relatos de estudos anteriores, relacionados tanto aos isolados de humanos quanto de animais (SECCHI et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

De acordo com Maranan et al. (1997) e Moon et al. (2007), o mecanismo de resistência à meticilina/oxacilina é muito complexo, envolvendo tanto fatores ambientais quanto a regulação de vários genes e seus respectivos produtos. Como resultado, a resistência fenotípica a estes antimicrobianos é muito variável, e tal variabilidade é conhecida como heterorresistência fenotípica, caracterizando-se pelo fato de que células em uma população bacteriana podem carregar o gene *mecA* e nem todas as bactérias com tal gene expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma e ao mesmo tempo. Os isolados resistentes à oxacilina que não apresentam o gene *mecA* podem estar associados à produção excessiva de  $\beta$ -lactamases (também conhecida como resistência *borderline*), o que resulta na hidrólise de agentes beta-lactâmicos, ou ainda alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP) sem ser a PBP2a (SECCHI et al., 2008, XU et al., 2012). Ao contrário, entre as amostras bacterianas avaliadas, aquelas que apresentam um fenótipo de sensibilidade e a presença do gene *mecA* estão associadas, provavelmente, a um alelo mutado ou ainda a uma diminuição na expressão dependente do ambiente (IKONOMIDIS et al., 2008).

No presente trabalho, 8,4 % das amostras de SCN e 15,8 % de *S. aureus* isoladas de QMF apresentam heterorresistência fenotípica, uma vez que carregam o gene *mecA* mas não se apresentaram o fenótipo de resistência relacionado à oxacilina.

Alguns autores consideram ainda que a resistência à oxacilina está associada à resistência cruzada com os aminoglicosídeos (FLUIT et al., 2000). No presente estudo, os resultados corroboram com esta afirmação, uma vez que a presença do gene *aacA-aphD* foi detectada em 41 % dos isolados resistentes à oxacilina e, entre estes microrganismos, observou-se resistência fenotípica à gentamicina em mais de 80 % dos isolados avaliados. Uma outra observação interessante, referente às bactérias que apresentam resistência associada à oxacilina, é que tal fenótipo de resistência se repete para outros fármacos, tais como os  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, tetracilinas e linezolidas (SIMEONI et al., 2008; HUBER et al., 2011). De fato, os

presentes resultados mostram a presença da associação dos marcadores genéticos *mecA*, *blaZ*, *msrA*, *msrB*, *linA*, *aacA-aphD* em 5,7 % dos isolados de SCN e, em todas estas 13 linhagens, confirmou-se o fenótipo de resistência associado a oxacilina, penicilina, eritromicina, azitromicina e gentamicina.

O índice elevado de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos nas linhagens de SCN e de *S. aureus* é bem estabelecido na literatura. Assim, não é surpreendente encontrar índices elevados da associação dos marcadores genéticos *mecA* e *blaZ* nas bactérias avaliadas neste estudo, presente em 48 % das linhagens bacterianas. Observou-se a resistência fenotípica associada à penicilina e/ou oxacilina em 94 % das amostras contendo tais marcadores.

Em relação às bactérias do gênero *Staphylococcus*, um dos mecanismos que confere resistência aos macrolídeos está associado à presença de uma bomba de efluxo, codificada pelos genes *msrA* e *msrB* que conferem informação de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas do tipo B, excluindo deste grupo as lincosamidas (FIEBELKORN et al., 2003). A partir dos resultados encontrados no presente estudo, podemos observar um índice de concordância elevado entre o fenótipo e genótipo de resistência aos macrolídeos testados, em que apenas 7,5 % das linhagens bacterianas recuperadas que apresentaram a associação dos marcadores *msrA* e *msrB* não se mostraram resistentes aos macrolídeos. Ainda em relação às amostras bacterianas resistentes aos macrolídeos, os marcadores *ermA*, *ermB* e *ermC*, quando detectados, estavam presentes em índices abaixo de 2 % das amostras avaliadas. Em um trabalho realizado com isolados de MSRA hospitalares no Japão, Sekiguchi et al. (2004), também observaram uma discrepância referente a susceptibilidade fenotípica e a presença dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*. Tais autores afirmam que tal fato ocorre em virtude de uma mutação na região codificante ou promotora dos genes.

A clindamicina, um antimicrobiano do grupo das lincosamidas, tem sido considerada como uma alternativa no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à meticilina/ oxacilina, bem como em pacientes que apresentam alergia à penicilina. No entanto, relatos do fenótipo de resistência associado a este fármaco tem se dispersado em todo o mundo, e este fato se deve principalmente pela presença do gene *linA*, responsável pela informação de

resistência (LÜTHJE et al., 2007; VIVEK et al., 2011, JUYAL et al., 2013). No presente estudo, observamos quase 60 % de resistência à clindamicina (considerando os resultados de resistência intermediária) para SCN e 16 % do mesmo fenótipo para as amostras de *S. aureus* (considerando também os resultados de resistência intermediária). Neste grupo, a relação positiva entre fenótipo e genótipo de resistência foi observada em aproximadamente 38 % de todos os isolados bacterianos.

Para alguns autores, a tolerância aos biocidas pode facilitar a prevalência de linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos na indústria de alimentos. Consideram ainda que a utilização de biocidas durante as etapas de processamento do alimento deve ser controlada, evitando assim a pressão seletiva em relação às linhagens bacterianas tolerantes aos antimicrobianos e aos biocidas (MORENTE et al., 2012). Assim, apesar de a susceptibilidade bacteriana aos biocidas não ter sido avaliada, os resultados encontrados neste trabalho são preocupantes, uma vez que o gene *smr* foi detectado em 63,4 % de todos os isolados bacterianos estudados, bem como a associação do gene *smr* e *qac* foi confirmada em aproximadamente 5 % das amostras. Vali et al. (2008) observaram a resultados semelhantes aos do presente estudo, com a presença do gene *smr* em 44 % e *qac* em 11,6 % dos isolados de *S. aureus* recuperados em ambiente hospitalar. Estes resultados merecem atenção, pois a presença destes genes fornece a informação de tolerância aos agentes desinfetantes mais comumente usados, independente da origem das amostras bacterianas.

Ainda, em algumas amostras bacterianas isoladas neste trabalho, observou-se a presença de marcadores genéticos de resistência sem relação correspondente com o devido fenótipo. Para explicar esta situação, alguns autores discutem situações envolvendo microrganismos que apresentam genes de resistência silenciados e que podem se tornar ativos, resultando então na expressão da resistência. (CHAMBERS et al., 1997; ZHU et al, 2007). Martineau et al. (2000) propõem então que estas linhagens bacterianas sejam tratadas como microrganismos resistentes, em decorrência de seu potencial para expressar o fenótipo da resistência.

No geral, a frequência elevada de *S. aureus* e SCN multi-resistentes aos antimicrobianos isolados a partir do QMF neste estudo (MAR > 0,2) é muito preocupante e sugere a necessidade de mudanças na regulação sanitária com relação à maioria dos queijos do tipo Minas Frescal consumidos no Brasil. De acordo com Spanu et al. (2012), a multirresistência e a resistência à meticilina/oxacilina são exemplos típicos de linhagens bacteriana associadas a seres humanos. Assim, como sugerido anteriormente neste estudo, é plausível supor que tais microrganismos, do gênero *Staphylococcus* associados às amostras de queijo, podem estar relacionados à contaminação humana, além da contaminação de origem animal. Os padrões de susceptibilidade antimicrobiana observados para os isolados de *S. aureus* e SCN podem refletir a resposta adaptativa microbiana ao uso e ao uso excessivo e irracional de antimicrobianos na sociedade moderna, como rotina nas atividades humanas.

## 7. CONCLUSÕES

- A ocorrência de contaminação estafilocócica observada em diferentes amostras de queijos Minas Frescal, muito além do que é permitido pela legislação vigente, suscita questionamentos em relação ao controle que deve ser realizado pelos órgãos de fiscalização competentes.
- As amostras de queijo Minas Frescal avaliadas são consideradas como não satisfatórias, considerando sobretudo os riscos que tal alimento impõe à saúde do consumidor, de acordo com seu padrão.
- O selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) não é suficiente para garantir uma boa qualidade microbiológica às amostras de queijo Minas Frescal, evidenciando assim uma necessidade de fiscalização mais rigorosa em todas as etapas de processamento do alimento.
- *Staphylococcus* coagulase negativo são prevalentes em altas contagens no queijo Minas Frescal industrializado, excedendo os limites impostos para contagens de *S. aureus*.
- A população de *Staphylococcus* coagulase negativo presentes nas amostras de queijo Minas Frescal produzidos com leite pasteurizado são representativas daquelas associadas à seres humanos, considerando-se seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.
- *Staphylococcus* coagulase negativo contaminantes de queijo Minas Frescal apresentam características descritas como fatores de virulência que reforçam seu papel de agressor oportunista para seres humanos e outros animais.
- A multirresistência observada entre as amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de queijo Minas Frescal ilustra e reforça a extensão do fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos.
- *Staphylococcus* isolados do queijo Minas Frescal são reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos mobilizáveis tanto para outras bactérias no alimento, quanto para outras bactérias no ambiente ou associadas aos consumidores.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP FM, SCHWARZ S: Antimicrobial resistance in staphylococci and streptococci of animal origin. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Editado por Aarestrup FM. Washington, DC: ASM Press; 2006:187–212.

ABREU, L. R. de. **Tecnologia do leite e derivados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 215 p.

ALAM, M. M.; KOBAYASHI, N.; UEHARA, N.; WATANABE, N. Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microb Drug Resist.** v. 9, p.109-121, 2003.

AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.55 no.5 p620-623, 2003.

ANAND, K. B.; AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin sreen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal od Medical Microbiology**. v. 27, p. 27-29, 2009.

ANDRADE, J. P. Efeito de concentração subinibitória de piperacilina-tazobactam na morfologia e fisiologia de *Escherichia coli*. 127f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, M.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 78, p. 2930–2935, 2012

ASHTON, T. R. Some bacteriological aspects of the deterioration of pasteurized milk. **J Dairy Res.** v. 17, p. 261-287, 1992.

ASSUMPÇÃO, E.G.; PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p.366-370, 2003.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializado no município de Piracicaba – SP. **Scientia Agrícola**, Piracicaba. v. 53, n. 1, 1996.

BANNERMAN, T. L.; *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grown aerobically*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, MURRAY, P. R.;

BARRON, E. J.; PFAELLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (eds), 9 ed., ASM Press. Washington, DC. p. 384-404, 2003.

BARBOSA, L. et al. Incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Hig Aliment.** v. 21, p. 105 – 109, 2007.

BEHMER, M. L. A.. **Tecnologia do leite.** 15 ed. São Paulo: Nobel, 1991, 320 p.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens.** ED. Marcel Dekker, INC., p. 463-523, 1989.

BERQUÓ, L. S.; BARROS, A. J. D.; LIMA, R. C.; BERTOLDI, A. D. Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. **Rev. Saúde Públ.** v. 38, p. 239-246, 2004.

BHARGAVA, K.; ZHANG, Y. Multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci in food animals. **J Appl Microbiol.** v. 113, p.1027-36, 2012.

BONNA, I. C. F.; SANTOS, A. P. V.; TEIXEIRA, G. N.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isolados de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*). **Rev. Bras. Ciênc. Vet.** v. 14, p. 117-121, 2007.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciênc. Rural.** v. 38, p. 1431-1438, 2008.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro – MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 59, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12: Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, Distrito Federal, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa IN nº 62: Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, Distrito Federal, 2003..

BRASIL. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 1997.

BRICIO, L.M.S.; SILVA, G.C.; FINGER, M.R. Qualidade bacteriológica do leite pasteurizado tipo C produzido no estado do Rio de Janeiro. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 12, p. 124-126, 2005.

BROEKEMA, N. M.; VAN, T. T.; MONSON, T. A.; MARSHALL, S. A.; WARSHAUER, D. M. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. **J Clin Microbiol.** v. 47, p. 217-219, 2008.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** v. 27, p.44-52, 2009.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CARVALHO, E. P. de. **Microbiologia de alimentos, saúde pública e legislação.** LAVRAS: UFLA/FAEPE, 2001. 171 p.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. *Staphylococci.* **Int J Antimicrob Agents.** v. 29, n.3, p. 3-32, 2007.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. de. *Lysteria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, p. 281-287, 2001.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; CHEHAB, O.; BOUCHAMI, O.; HASEN, A. B.; MAHDOUANI, K.; BAKHROOUF, A. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 60, p. 183-187, 2007.

CHAMBERS, H. F. Methicillin/oxacillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin Microbiol Rev.** v. 10, p. 781-791, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Information Supplement M100-S22, Wayne, PA: CLSI, 2012.

COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P. G.; SOUZA, M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciênc. Rural.** v.37, p.195-200, 2007

CORREA, J. E. ; PAULIS, A.; PREDARI, S.; SORDELLI, D. O.; JERIC P. E. First report of *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. **J Antimicrob Chemother.** v. 62, p. 956-60, 2008.

COTON, E.; DESMONTS, M. H.; LEROY, S.; COTON, M.; JAMET, E.; CHRISTIEANS. S.; DONNIO, P.Y.; LEBERT, I.; TALON, R. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages,

processing environments, and clinical samples. **Int J Food Microbiol.** v. 137, p. 221-229, 2010.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev.** v. 13, p. 16-34, 2000.

DONLAN RM. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. **Clin Infect Dis.** v.33, p.1387-1392, 2001.

DOYLE, M. E.; HARTMANN, F. A.; WONG, A. C. L. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? **Anim Health Res Rev.** v. 13, p.157-180, 2012.

EMANEINI, M.; TAHERIKALANI, M.; ESLAMPOUR, M. A.; SEDAGHAT, H.; ALIGHOLI, M.; JABALAMELI, F.; SHAHSAVAN, S.; SOTOUDEH, N. Phenotypic and genotypic evaluation of aminoglycoside resistance in clinical isolates of staphylococci in Tehran, Iran. **Microb. Drug Resist.** v. 15, p. 1-4, 2009.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/s/Staphylococcus.html>. Acesso em: 18/03/2013.

FESSLER, A. T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **J Antimicrob Chemother.** v. 65, p. 1576–1582, 2010.

FIEBELKORN, K. R.; CRAWFORD, S. A.; MCELMEEL, M. L.; JORGENSEN, J. H. The practical disc diffusion method for the detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus*. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 4740-4744, 2003.

FLUIT, A. C.; JONES, M. E.; SCHMITZ, F. J.; ACAR, J., GUPTA, R., VERHOEF, J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. **Clin Infect Dis.** v. 30, p. 454-460, 2000.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: AN Aspen Publication, 2000. 587 p.

FRANCO, B. G. M. F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FUKUSHIMA, H.; TSUNOMORI, Y.; SEKI, R. Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 5134-5146, 2003.

FUNG, H. B.; KIRSCHENBAUM, H. L.; OJOFEITIMI, B. O. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. **Cin Ther.** v. 23, p. 356-391, 2001.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2ª ed. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Edição revisada e ampliada. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora. 2005. 200p.

GATERMANN, S. G.; KOSCHINSKI, T.; FRIEDRICH, S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 13, p. 777–781, 2007

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods*. v. 42, p. 175-184, 2000.

GÓMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; BLANCO, J. L.; RUIZ-SANTA-QUITÉRIA, J. A.; DOMÍNGUEZ, L., SUÁREZ, G. Production of enterotoxin A by nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Environmental Microbiology**. v. 55, p. 1447-1451, 1989.

GU B, KELESIDES T, TSIODRAS S, HINDLER J, HUMPHRIES RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrob Chemother**. v. 68, p. 4-11, 2013.

HEIR, E; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. **Int J Food Microbiol**. v. 48, p. 211-219, 1999.

HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V. da; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São Jose, SP. **Hig Aliment**. v. 16, p.69-76, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T. **Bergey’s manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUBER, H., ZIEGLER, D., PFLUGER, V., VOGEL, G., ZWEIFEL, C. and STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. **BMC Vet Res**. v .7, p. 6-12, 2011.

IKONOMIDIS, A.; MICHAEL, G.; VASDEKI, A.; LABROU, M.; KARAVASILIS, V.; STATHOPOULOS, C.; MANIATIS, A.N.; POURNARAS, S. In Vitro and In Vivo Evaluations of Oxacillin Efficiency against *mecA*-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 52, p. 3905-3908, 2008.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **Int J Food Microbiol**. v. 126, p. 302-310, 2008.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas frescal. **Sci Agric**, v.50, p. 451-454, 1993.

JARLVO, J. O. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. **APMIS Suppl**, v. 91, p. 1-42, 1999.

JOHN, M. A.; BURDEN, J.; STUART, J. I.; REYES, R. C.; LANNIGAN, R.; MILBURN, S.; DIAGRE, D.; WILSON, B.; HUSSAIN, Z. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. **J Antimicrob Chemother**. v. 63, p. 493-496, 2009.

JUYAL, D.; SHAMANTH A. S.; PAL, S.; SHARMA, M. K.; PRAKASH, R.; SHARMA, N. The Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance Among Staphylococci in a Tertiary Care Hospital – A Study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. **J Clin Diagn Res**. v. 7, p. 61-65, 2013.

KAASE, M.; LENG, S.; FRIEDRICH, S. SZABADOS, F.; SAKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S. G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**. v. 14, p. 614-616, 2008.

KONEMAN, E. W., et al. Diagnóstico **microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro : Medsi, 2008. 1565 p.

KRUMPERMAN, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing *Escherichia coli* to identify risk sources of faecal contamination of foods. **Appl Environ Microbiol**. v. 46, p. 165-170, 1983.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. **J Biosci**. v. 36, p.175-188, 2011.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Appl Environ Microbiol**. v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M.E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 43, p. 1062-1066, 1999.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciênc. Rural**, v. 31, p. 1063-1067, 2001.

LOVSETH A, LONCAREVIC S, and BERDAL KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolate. **J Clin Microbiol**. v. 42, p. 3869-3872, 2004.

LUBECK, G.M.; LARA, J.A. F.; BAGATINI, L. et al. Avaliação de algumas características físico-químicas e microbiológicas de algumas marcas de queijo tipo colonial produzido no sudoeste do estado do Paraná. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.56, p.185-193, 2001.

LUCAS, M. F.; ERRECALDE, J. O.; MESTORINO N. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **J Vet Pharmacol Ther.** v. 33, p. 132-140, 2010.

LÜTHJE, P.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. **J Antimicrob Chem.** v. 59, p. 600-606, 2007.

LYON, B. R.; SKURRY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiology Review.** v. 51, p. 88-134, 1987.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do Queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, MG. **Ciênc Tecnol Aliment.** v. 24, p. 516-521, 2004.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** 9<sup>a</sup> ed. New Jersey. Prentice Hall. 2004.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cell Mol Life Sci.** v. 67, p. 3057–3071, 2010.

MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ, G.; MARRERO, A.; GARCÍA-PIQUÈ, S.; GARCÍA-CASTELLANOS, R.; GOMIS-RÜTH FX. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. **FEMS Microbiol Lett.** v. 235, p. 1-8, 2004.

MARANAN, M. C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infect Dis Clin North Am.** v. 11, p. 813-49, 1997.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, p. 231-238, 2000.

MARTINS, A.; CUNHA, M. L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiol Immunol.** v. 51, p. 787-95, 2007.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, p. 399-406, 2007.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E.S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **J Dairy Sci.** v. 90, p. 1176-1185, 2007.

MULLARKY, I. K.; SU, C.; FRIEZE, N.; PARK, Y. H.; SORDILLO, L. M. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. **Infect Immun.** v. 69, p. 45-51, 2001.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin.** v 48, p.579-82, 1990.

NOGUCHI, N.; SUWA, J.; NARUI, K.; SASATSU, M.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; SONG, J. H. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. **J Med Microbiol.** v. 54, p. 557-65, 2005.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBRÓSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A. L.; VIRGÍLIO, S. CELANO, G. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **Int J Food Microbiol.** v. 117, p. 219-222, 2007.

OKURA, M. H; MOACIR, J. Avaliação das condições higiênicos-sanitárias de queijos Minas Frescal produzidos com leite cru, leite pasteurizado, e de queijo temperado em alguns municípios da região do triângulo mineiro. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.** v. 65, p. 33-42, 2010.

OLIVEIRA, A.M.; MIYA, N. T. N.; SANT'ANA, A. S.; PEREIRA, J. L. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. **J. Food Sci.** v. 75, p. 475-481, 2010.

OLIVEIRA, C. A. F. de; MORENO, J. F. G.; MISTIER, L.; GERMANO, P. M. L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Hig Aliment.** v. 12, p. 31-35, 1998.

OLIVEIRA, G. A. LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. *Staphylococcus aureus* apresentando resistência intermediária à vancomicina: mecanismos de resistência, detecção laboratorial e perspectivas de emergência no Brasil. **J Bras Patol.** v. 36, p. 96-102, 2000.

OLIVEIRA, P. H. B. A. A importância da pasteurização do leite para a saúde pública. Editorial. Em 27/02/2013. Ciência do leite. <http://www.cienciadoleite.com.br/?action=7&r=71> em 01/03/2013.

OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. da. S.; ABREU, M. C. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Teresina, PI. **Rev. Hig Aliment.** v. 17, p. 92-94, 2003.

MORENTE, E. O.; FERNÁNDEZ-FUENTES M. A.; GRANDE BURGOS MJ, ABRIOUEL H, PÉREZ PULIDO R, GÁLVEZ A. Biocide tolerance in bacteria. **Int J Food Microbiol.** v. 162, p. 13-25, 2013.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infect Immun.** v. 69, p. 360-366, 2001.

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

PEREIRA, M.A.; PEREIRA, J.L.; SERRANO, A.M.; BERGDOLL, M.S. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? **Hig Aliment.** v.14, p.32-39, 2000.

PERRETEN, V.; GIAMPA, N.; SCHULER-SCHMID, U.; and TEUBER, M. Antibiotic Resistance Genes in Coagulase-negative Staphylococci Isolated from **Food System. Appl. Microbiol.** v. 21, p. 113-120, 1998.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quím Nova.** v. 27, p. 293-300, 2004.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T., DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J Antimicrob Chemother.** v. 53, p. 28-52, 2004.

PICOLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C. P. T.; SCHIMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciênc Tecnol Aliment.** v. 1, p. 64-69, 2006.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Vet Microbiol.** v.134, p. 45–54, 2009.

PINHO, M.G: Mechanisms of  $\beta$ -lactam and glycopeptides resistance in *Staphylococcus aureus*. In **Staphylococcus molecular genetics**. Edited by Lindsay JA. Norwich, Norfolk, UK: Caister Academic Press; p 207–226, 2008.

PINTO, F.G.S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A.C. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, BRASIL. **Arq. Inst. Biol.** v.78, p.191-198, 2011.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. A. I.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: problema emergente na vigilância sanitária. **Hig Aliment.** v. 10, p. 23-27, 1996.

PODKOWIK, M.; BYSTRÓN, J.; BANIA, J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. **Foodborne Pathog Dis.** v. 9, p. 91-93, 2012.

QUIBLIER, C.; ZINKERNAGEL, A. S.; SCHUEPBACH, R. A.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. M. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. **BMC Microbiology.** v. 11, p. 72-84, 2011.

RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; DEUS, M. F. R.; SOUSA, D. C.; CAMARGO, C. H.; GODINHO, N. C.; GALINDO, L. A.; SOARES, T. C. S.; ARAÚJO Jr, J. P. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. **Foodborne Pathog Dis.** v. 7, p.1121-1123, 2010.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de queijo tipo coalho. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v. 56, p. 130-133, 2004.

RESCH, M.; NAGEL, V.; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **Int J Food Microbiol.** v. 127, p. 99-104, 2008.

RICE, L. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **Am J Med.** v. 119, p. S11–S19, 2006.

RIZEK, C. F.; MATTÉ, M. H.; DROPA, M.; MAMIZUKA, E.M.; de ALMEIDA, L. M.; LINCOPAN, N.; MATTÉ, G. R.; GERMANO, P. M. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. **Foodborne Pathog Dis.** v. 8, p. 561-3, 2011.

RHODEN, D. L.; MILLER, J. M. Four-year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus* spp. **J Clin Microbiol.** v. 33, p. 96-98, 1995.

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, p.263-272, 2006.

ROHDE, H.; KALITZKY, M.; KROGER, N.; SCHERPE, S.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K.; ZANDER, A. R.; MACK, D. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. **J Clin Microbiol.** v. 42, p. 5614–5619, 2004.

- SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracajú, SE. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v. 60, p. 1517-1522, 2008.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.** v. 77, p. 545-554, 2010.
- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, p. 413-423, 2007
- SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Vet Microbiol.** v. 134, p. 73-81, 2009.
- SCANVIC, A.; DENIC, L.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A.; LUCET, J. C. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. **Clin Infect Dis.** v. 32, p. 1393-1398, 2001.
- SECCHI, C.; ANTUNES, A. L. S.; PEREZ, L. R. R.; CANTARELLI, V. V.; D'AZEVEDO, P. A. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. **Brazilian J Infect Dis.** v. 12, p. 316-320, 2008.
- SEKIGUCHI, J.; HAMA, T.; FUJINO, T.; ARAAKE, M.; IRIE, A.; SARUTA, K. Detection of the antiseptic- and disinfectant-resistance genes *qacA*, *qacB*, and *qacC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Tokyo hospital. **Jpn J Infect Dis.** v. 57, p. 288-91, 2004.
- SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; COCCONCELLI, P.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiol.** v. 25, p. 196–201, 2008.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food Bioprod Process.** v. 84, p. 338-345, 2006.
- SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; FERRER, C. P.; TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Vet Microbiol.** v. 158, p. 344-352, 2012.
- SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. N.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-

negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciênc. Rural**. v. 38, p. 1346-1350, 2008.

SORUM, H.; L'ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **Int J Food Microbiol**. v. 78, p.43-56, 2002.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **Int J Food Microbiol**. v. 153, p. 53-57, 2012.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycin resistance in Staphylococci. **Clin Microbiol Rev**. v. 15, p. 430-438, 2002.

STEERS, E.; FILTZ, E.L.; GRAVES, B. S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiot Chemother**. v. 9, p. 307-311, 1959.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTW, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. v. 41, p. 4089-4094, 2003.

SU, Y.; WONG, A. C. L. Optimal condition for the production of unidentified staphylococcal enterotoxins. **J Food Protect**. v. 56, p. 313-316, 1993.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Curr Opin Microbiol**. v. 4, p. 493-499, 2001.

VALI, L.; DAVIES, S. E.; LAI, L. L. G.; DAVE, J.; AMYES, S. G. B. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J Antimicrob Chemother**. v. 61, p. 524–532, 2008.

VARGA, M.; KUNTOVA, L.; PANTUCEK, R.; MASLANOVA, I.; RUZICKOVA, V.; DOSKAR, J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. **FEMS Microbiol Lett**. v. 332, p. 146–152, 2012.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, **Brazil**. **Int J Infect Dis**. v. 12, p. 410-415, 2008.

VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos gram positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesq Vet Bras.** v. 23, p. 47-51, 2003.

VIVEK, J. S.; RAJESH, G. N.; MUKESH, S.; MANPREET, K.; MISRA, R. N.; MATNANI, G. B. The prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital in India. **Biom Res.** 2011;22(4):465-69.

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

WANG, H. H.; MANUZON, M.; LEHMAN, M.; WAN, K.; LUO, H.; WITTUM, T. E.; YOUSEF, A.; BAKALETZ, L. O. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiol Lett.** v. 254, p. 226-231, 2006.

WANG, X.; MENG, J.; ZHOU, T.; ZHANG, Y.; YANG, B.; XI, M.; SHENG, J.; ZHI, S.; XIA, X. Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from food and food animals. **Foodborne Pathog Dis.** v. 9, p. 95-101, 2012.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol.** v. 140, p. 418-29, 2010.

WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá – MT. **Hig Aliment.** v. 9, p. 11-14, 1995.

WILKINSON, B. J. Biology. In: **The staphylococci in human disease**, Crossley, K. b. & Archer, G. L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p. 1-38, 1997.

XU, B.; LIU, L.; LIU, L.; LI, X.; LI, X.; WANG, X. A multiplex PCR assay for the rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **J Food Sci.** v. 77, p. M638-M642, 2012.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZHANG K, SPARLING J, CHOW BL, ELSAYED S, HUSSAIN Z, CHURCH DL, GREGSON DB, LOUIE T, and CONLY JM. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance, and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **J Clin Microbiol.** v. 42, p. 4947-4955, 2004.

ZHANG, Y.; AGIDI, S.; LEJEUNE, J. T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. **J Appl Microbiol.** v. 107, p. 1375-1383, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LEJEUNE, J. T.; ZERVOS, M.; BHARGAVA, K. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. **Res Vet Sci.** v. 90, p. 23-25, 2011.

ZHU, L.; ZHANG, Z.; WANG, C.; YANG, H.; JIANG, D.; ZHANG, Q.; MITCHELSON, K.; CHENG, J. Use of a DNA Microarray for Simultaneous Detection of Antibiotic Resistance Genes among Staphylococcal Clinical Isolates. **J Clin Microbiol.** v. 45, p. 3514-3521, 2007.

ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAYMUNDO, N.K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Arch Vet Sci.** v.7, p.59-67, 2002

## APÊNDICES

### Apêndice A: Artigo publicado

**“Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of *mecA*-Encoding Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Soft Cheese in Brazil.”**

Cláudia Oliveira Fontes, Vânia Lúcia Silva, Mayara Rodrigues Brandão de Paiva, Rafaela Alvim Garcia, Juliana Alves Resende, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado, and Cláudio Galuppo Diniz.

2013 Institute of Food Technologists R \_

doi: 10.1111/1750-3841.12088 Vol. 00, Nr. 0, 2013 \_ Journal of Food Science

M1

# Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of *mecA*-Encoding Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Soft Cheese in Brazil

Cláudia Oliveira Fontes, Vânia Lúcia Silva, Mayara Rodrigues Brandão de Paiva, Rafaela Alvim Garcia, Juliana Alves Resende, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado, and Cláudio Galuppo Diniz

**Abstract:** Coagulase-negative staphylococci (CoNS), which are generally neglected as foodborne bacteria, are emerging as significant opportunistic pathogens that may be highly resistant to available antimicrobial drugs. In this study, antimicrobial susceptibility patterns, *mecA* gene occurrence, and virulence-associated characteristics were evaluated in CoNS isolated from soft cheese in Brazil. A total of 227 bacterial isolates were recovered from 35 cheese samples belonging to 5 batches with 7 different trademarks. The CoNS counts ranged from  $10^6$  to  $10^7$  CFU/g. High antimicrobial resistance percentages were observed for oxacillin (76.2%), penicillin (78.5%), erythromycin (67.8%), gentamicin (47.2%), clindamycin (35.7%), rifampicin (26.8%), azithromycin (14.7%), tetracycline (14.7%), levofloxacin (14.2%), and sulfamethoxazole-trimethoprim (11.9%). A low antimicrobial resistance percentage was observed for chloramphenicol (2.3%), and all of the tested bacteria were susceptible to vancomycin and linezolid. In total, a multiple antibiotic resistance (MAR) index of  $>0.2$  was observed for 80.6% of the isolated CoNS. However, the MAR index ranged from 50% to 92.6% when only bacterial cheese isolates belonging to the same trademark were considered. Regarding to the prevalence of CoNS carrying *mecA* gene, 81.5% of the isolated strains were *mecA*<sup>+</sup>, and 76.2% of these were phenotypically resistant to oxacillin. Three isolates carried the enterotoxin A gene (*sea*), 29.5% produced biofilm in a laboratory test, and  $\alpha$ - or  $\beta$ -hemolysis were observed for 3% and 5.2%, respectively. This study highlights the extent of the antimicrobial resistance phenomenon in neglected foodborne microorganisms and the potential public health risks that are related to the consumption of CoNS-contaminated soft cheese.

**Keywords:** antimicrobial agents, coagulase-negative *Staphylococcus*, food safety, foodborne microorganisms, pathogens

## Introduction

Minas cheese is the most popular soft cheese consumed in Brazil and has a significant impact for manufacturing industry, particularly in the Minas Gerais State (Sobrinho and others 2012). This is a soft and fresh white cheese with a pH ranging from 5.5 to 6.5, a high moisture content ( $>55\%$ ), and a low percentage of salt (usually 1.7%) (Brasil 2004). Minas cheese is produced on both industrial and domestic scales by the direct acidification of pasteurized (industrial) or raw (domestic) milk or by the addition of lactic acid bacteria cultures (Carvalho and others 2007).

The food chain can be considered an important source for antibiotic-resistant bacteria transmission between animal and human populations and also acts as a potential carrier of microorganisms such as *Staphylococcus* spp. (Phillips and others 2004).

*Staphylococcus* spp., especially coagulase-negative staphylococci (CoNS), are ubiquitously distributed in nature with several species inhabiting different ecosystems. These bacteria are also naturally found on the skin and mucous membranes of humans and animals (Irlinger 2008). In addition, they are frequently isolated from a

wide range of foodstuff, such as cheese, although there are no regulations concerning the detectable limits of these bacteria in food (Brasil 2001; Coton and others 2010).

CoNS are recognized as the etiologic agent of a wide variety of infections. They may play a role in bacteremia, central nervous system shunt infection, endocarditis, urinary tract infection, surgical site infection, endophthalmitis, foreign body infection, and many other infections. The distinction between clinically significant, pathogenic, and contaminating isolates is difficult and remains a major problem (Piette and Verschaegen 2009). CoNS characteristics that may contribute to virulence include the ability to produce extracellular polymers, enterotoxins, and hemolysins (Piette and Verschaegen 2009). Biofilm production by CoNS significantly impacts their persistence, both in biological tissues and on inanimate surfaces, because biofilm-associated bacteria are highly adherent and exhibit decreased susceptibility to detergents, biocides, and antimicrobial agents (Donlan 2001; Araújo and others 2011). With regards to enterotoxin production, the staphylococcal enterotoxins A and B are the most prevalent toxins involved in food poisoning (Veras and others 2008). Antimicrobial resistance is also considered an important virulence factor for CoNS strains.

Antibiotic resistance in food-related bacteria has rapidly emerged and is attributed to the large use of antimicrobials in human and veterinary medicine (Teuber 2001; Wang and others 2006). The incidence of antimicrobial resistance in

MS 20121645 Submitted 11/29/2012, Accepted 1/23/2013. Authors are with Dept. of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal Univ. of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Direct inquiries to author Diniz (E-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br).

© 2013 Institute of Food Technologists  
doi: 10.1111/1750-3841.12088  
Further reproduction without permission is prohibited

Vol. 00, Nr. 0, 2013 • Journal of Food Science M1

**Table 1**—Primers used, expected amplicons, and PCR conditions.

Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	PCR conditions	Reference
<i>Staph756F</i>	AAC TCT GTT ATT GAA GAA CA	750	94 °C 5 min; 10 × (94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 1 min); 25 × (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min); 72 °C 10 min	Zhang and others (2004)
<i>Staph750R</i>	CAA CCT TCC GGT TTG TCA CC			
<i>mecA1</i>	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310		
<i>mecA2</i>	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A			
<i>coa1</i>	ACC ACA AGG TAC TAG ATC AAC G	Variable	95 °C 30 s; 40 × (95 °C 30 s, 55 °C 2 min, 72 °C 2 min); 72 °C 5 min	Mullarky and others (2001)
<i>coa2</i>	TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC			
<i>sea1</i>	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	521	95 °C, 10 min; 15 × (95 °C, 1 min, 68 °C 45 s, 72 °C 1 min); 20 × (95 °C 1 min, 64 °C 45 s, 72 °C 1 min); 72 °C 1 min	Lovseth and others 2004
<i>sea2</i>	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG			
<i>seb1</i>	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	667		
<i>seb2</i>	TCG AGG CAT CAT GTC ATA CCA			
<i>set1</i>	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TA CAA	284		
<i>set2</i>	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA			
<i>sed1</i>	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C	385		
<i>sed2</i>	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G			

cheese-associated bacteria may impact public health because of risks associated with the maintenance of multidrug-resistant microorganisms, such as CoNS (Rohde and others 2004; Wang and others 2006; Amador and others 2009). The horizontal transfer of genetic determinants related to antibiotic resistance in foodstuff should be of particular concern. It has been previously suggested that exchange of mobile DNA elements between microorganisms may occur during food processing (Resch and others 2008; Spanu and others 2010).

Several mechanisms are involved in antibiotic-resistant CoNS, and the emergence of methicillin or oxacillin-resistant staphylococci has widely been reported in the last few years (Resch and others 2008; Spanu and others 2010).

Considering the increase in antimicrobial resistance and its consequences on human and animal medicine (ASM 2009), as well as the lack of regulations regarding the occurrence of viable CoNS associated with cheese, this study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility patterns, *mecA* gene occurrence, and virulence-associated characteristics of CoNS isolated from Minas Cheese manufactured in Brazil.

## Materials and Methods

### Bacterial isolates and DNA extraction

Representative samples (35) from 5 batches of 7 different industrially made trademarked Minas soft cheeses were purchased from different grocery stores in Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil. According to the manufacturers, these cheeses were produced by direct acidification (enzymatic coagulation). The samples were kept in an ice box and promptly sent to the laboratory for immediate processing. Cheese aliquots (25 g) were aseptically handled, weighed, and homogenized with 225 mL of a 2% sterile peptone water (w/v) solution. Serial dilutions (10-fold) were performed and 0.1 mL aliquots were plated on Mannitol Salt Agar (MSA) (HiMedia, Mumbai, Maharashtra, India). The plates were incubated at 35.5 °C for up to 48 h, and the CFU/g of cheese was obtained.

Following culture selection and total CFU count in each plate, for those which CFU counts ranged between 25 and 250, 5 to 10 presumptive colonies were randomly picked to represent the CoNS populations. After microbial identification, typical and atypical CoNS colonies were combined to determine the total CFU count. Selected bacteria were subcultured on Tryptic Soy Agar (HiMedia) and further identified as *Staphylococcus* sp. by cellular morphology and Gram staining. Common biochemical tests,

such as high salt tolerance, DNase production, mannitol acidification, the production of carbon dioxide from glucose, and catalase, were also conducted according to established procedures (Brasil 2003). Bacterial isolates initially identified as *Staphylococcus* were subsequently confirmed by polymerase chain reaction (PCR) that targeted the 16S rRNA and coagulase (*coa*) genes (Table 1).

Genomic DNA was extracted by chemical digestion based on methodology described by Giraffa and others (2000), with modifications. Briefly, bacterial cells from 2 mL of overnight Tryptic Soy Broth (HiMedia) cultures were pelleted by centrifugation and solubilized in 500 µL of bacterial lysis buffer (25% w/v sucrose in 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L<sup>-1</sup> EDTA, and 2.5 mg/mL lysozyme). The suspension was incubated at 37 °C for 60 min. Following the incubation, 50 µL of 20% (w/v) SDS solution was added, and the mixture was set at room temperature for 30 min. The DNA was extracted 3 times with equal volumes of phenol and chloroform (1:1), followed by ethanol precipitation and RNase treatment (10 µg/mL). After extraction, DNA was quantified and stored at -20 °C.

### Antimicrobial susceptibility testing and screening of the *mecA* gene

The minimal inhibitory concentrations (MICs) for antimicrobial drugs were determined by the agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standard Inst. guidelines (CLSI 2012). Antibiotic stock solutions were added to melted Muller-Hinton agar (HiMedia) to obtain final concentrations ranging from 0.06 to 1.024 µg/mL. The antimicrobial drugs were selected on the basis of their antimicrobial spectra and clinical relevance and include the following list of drugs: penicillin, oxacillin, vancomycin, gentamicin, tetracycline, levofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, chloramphenicol, erythromycin, azithromycin, linezolid, clindamycin, and rifampicin. All of the drug powders were of a certified analytical grade (Medquímica Pharmaceutical Industry, Juiz de Fora, MG, Brazil). The reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was included as a control, and all of the tests were performed in duplicate. Using CLSI guidelines, the isolates were classified as susceptible, intermediate, or resistant to each antimicrobial agent tested.

To determine the level of antibiotic resistance of the individual isolates independent of the multidrug-resistant status of the isolate, the multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated as previously described (Krumperman 1983). Briefly, the

number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance was divided by the total number of antibiotics tested. A MAR value  $> 0.2$  was indicative of a multiple antibiotic-resistant phenotype.

The *mecA* gene was detected by PCR according to previously established methodology (Zhang and others 2004). All of the PCR reactions were performed in duplicate (Table 1). As positive and negative controls for *mecA* amplification, we included 3 staphylococci strains for which the presence or absence of *mecA* is known (*S. aureus* ATCC 33591 as a positive control, and *S. aureus* ATCC 29213 and *S. epidermidis* ATCC 12228 as negative controls).

#### Evaluation of CoNS virulence characteristics

Bacterial adhesive properties were determined by the ability of the bacteria to aggregate into an experimental biofilm according to established methodology (Pumbwe and others 2008). Using polystyrene microtiter plates, the absorbance of incorporated crystal violet dye by bacterial aggregates was measured. The absorbance is indicative of the density of adherent bacteria, and the results were reported as the average  $\pm$  the standard deviation from 3 separate experiments.

Hemolytic activity was evaluated on sheep blood agar plates. Each isolate was spot-inoculated, and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. The zone of clearance was recorded, and hemolytic activity was evaluated as previously described (Quiblier and others 2011).

Enterotoxigenic CoNS isolates were identified by PCR that targeted the staphylococcal enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec*, and *sed*, as previously described (Table 1). The reference strains *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 14458, *S. aureus* ATCC 19095, *S. aureus* ATCC 23235, and *S. xylosus* ATCC 29971 were used as positive controls for *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and a negative control, respectively.

#### Results

All the tested Minas cheese samples were positive for CoNS presence. A total of 227 isolates were identified based on their 16S rRNA sequence, and the absence of coagulase (*coa*) gene. Overall, the bacterial counts on MSA ranged from  $3.88 \times 10^6$  to  $2.85 \times 10^7$  CFU/g (Figure 1).

The antimicrobial drug susceptibility patterns for the isolated microorganisms are shown in Table 2. The susceptibility patterns

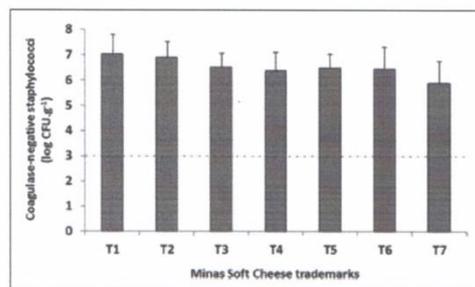


Figure 1—Mean coagulase-negative *Staphylococcus* sp. counts (log CFU/g) by cheese trademarks. Five different batches were representatively evaluated from each cheese trademark (T). Dotted line represents the maximum *S. aureus* counts according to the Brazilian sanitary regulations for safe consumption (Brasil 2001).

for the reference strain *S. aureus* ATCC 29213 were in accordance with CLSI guidelines. Of the 13 experimentally tested antimicrobials, the least effective drugs were penicillin G, oxacillin, and erythromycin with bacterial resistance percentages over 67%. Less effective drugs also included gentamicin and clindamycin (47.2% and 35.7% resistance, respectively). Resistance of 14.7%, 14.2%, and 11.7% was also observed for tetracycline, levofloxacin, and sulfamethoxazole-trimethoprim, respectively. Finally, rifampicin, azithromycin, chloramphenicol, vancomycin, and linezolid were the most effective antimicrobials with bacterial sensitivity percentages of 61.6%, 76.3%, 97.17%, 100%, and 100%, respectively.

The MAR indices for the antimicrobial-resistant bacteria are shown in Table 3. Based on this parameter, 80.6% of the CoNS isolates were classified as multidrug-resistant with a MAR index  $> 0.2$ . Considering only bacteria that belonged to the same trademark, the percentage of isolates with MAR indices  $> 0.2$  ranged from 50% to 92.6%.

Screening for the presence of *mecA* showed that 185 out of 227 CoNS samples were *mecA*<sup>+</sup> (81.5%), whereas only 173 (76.2%) were oxacillin-resistant (Table 3).

In this study, 3 CoNS isolates were found to carry the enterotoxin A gene and 30% were capable of biofilm production. With regards to hemolytic activity,  $\alpha$ - and  $\beta$ -hemolysis were observed for 3% and 5.3% of the identified CoNS, respectively (Table 3).

#### Discussion

Recently, CoNS have emerged as significant opportunistic pathogens in both human and veterinary medicine (Rohde and others 2004; Piette and Verschraegen 2009). These bacteria may initially spread from animals because they normally exist as members of the resident microbiota on animal skin and mucous membranes (Sawant and others 2009; Conton and others 2010). In the food industry, CoNS have previously been considered to be contaminants without any risks to consumers' health. However, the discovery that CoNS may produce enterotoxins required that the importance of these microorganisms be reconsidered, and their significance in public health has become a worldwide concern (Oliveira and others 2010; Rall and others 2010). Although there are few studies to compare our results, the high frequency of biofilm-producing isolates from industrialized soft cheese may represent risks associated not only with the host-bacteria relationship but also with bacterial persistence throughout the industrial chain. It is well accepted that bacteria may persist in biofilms due to their surface adhesiveness and resistance to physical, chemical, and biological factors, such as heat, detergents, dehydration, biocides, and antimicrobials (Simojoki and others 2012). In addition, the occurrence of hemolytic bacteria and those harboring enterotoxin genes, including staphylococcal enterotoxin A gene, is of concern regarding host-bacteria relationships. However, one important caveat is that the presence of an enterotoxin gene does not indicate that enterotoxin is expressed and present in food. Among the staphylococcal enterotoxins, enterotoxins A and B are the most prevalent in food poisoning. Veras and others (2008) evaluated the enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. in Brazil in this context and found that 38% of the tested strains isolated from food poisoning outbreaks harbored the enterotoxin A, B, and C genes.

To date, the Brazilian Sanitary Authority limits *S. aureus* counts in foodstuff like soft cheese to a maximum of  $10^2$  CFU/g, but there is no specific limit on CoNS counts (Brasil 2001). In light of this information, the detection of high CoNS counts in most

**Table 2—Antimicrobial susceptibility patterns for 227 cheese-associated coagulase negative staphylococci isolated from 35 cheese samples obtained from 5 batches of 7 different trademarks.**

Antimicrobial drugs	Minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )			Susceptibility patterns (%)		
	MIC <sub>50%</sub> (n)	MIC <sub>90%</sub> (n)	Range	S	IR	R
Penicillin G	2	4	0.0625 to >1024	13.8	7.7	78.5
Oxacillin	16	64	0.125 to 1024	23.8	—	76.2
Vancomycin	2	4	0.25 to 4	100	—	—
Gentamicin	8	32	0.125 to 1024	21.2	31.6	47.2
Tetracycline	0.5	32	0.125 to 128	84.5	0.8	14.7
Levofloxacin	1	4	0.125 to >1024	78.9	6.9	14.2
Sulfamethoxazole-trimetropim	2	8	0.125 to >1024	1.7	86.6	11.7
Chloramphenicol	8	8	8 to 64	97.7	—	2.3
Erythromycin	16	>1024	0.0625 to >1024	9.8	22.4	67.8
Azithromycin	1	128	0.0625 to >1024	76.3	9	14.7
Linezolid	1	4	0.0625 to 4	100	—	—
Clindamycin	1	32	0.0625 to 1024	44.2	20.1	35.7
Rifampicin	0.25	8	0.0625 to 32	61.6	11.6	26.8

**Table 3—Distribution of 227 CoNS by cheese trademarks, considering characteristics such as *mecA* gene detection, oxacillin-resistance, multidrug-resistance (MAR) index, biofilm production, and hemolytic activity. Five different batches were representatively evaluated from each cheese trademark.**

Cheese trademark	Number of CoNS Isolates	<i>mecA</i> <sup>+</sup> CoNS n (%)	Oxacillin-resistance n (%)	MAR index > 0.2 n (%)	Biofilm production n (%)	Hemolytic activity n (%)	
						$\alpha$	$\beta$
1	36	28 (77.8)	31 (86.1)	32 (89)	5 (13.9)	1 (2.8)	1 (2.8)
2	48	42 (87.5)	38 (79.2)	43 (89.6)	7 (14.6)	4 (8.3)	1 (2.1)
3	27	19 (70.4)	24 (88.8)	25 (92.6)	7 (25.9)	—	—
4	35	28 (80.0)	25 (71.4)	25 (71.4)	7 (20.0)	1 (2.8)	1 (2.8)
5	25	21 (84.0)	23 (92)	22 (88)	13 (52)	—	1 (4)
6	26	19 (73.0)	11 (42.3)	13 (50)	13 (50)	1 (3.8)	7 (26.9)
7	30	28 (93.3)	21 (70)	23 (76.7)	16 (53.3)	—	1 (3.3)
Total	227	185 (81.5)	173 (76.2)	183 (80.6)	68 (30)	7 (3)	12 (5.3)

M: Food Microbiology & Safety

of the soft cheese brands examined in this study is of concern, especially considering the antimicrobial resistance levels and virulence characteristics exhibited by the CoNS isolates. These findings suggest that these products are an important reservoir for multidrug-resistant opportunistic pathogens, as has already been demonstrated for *S. aureus* and suggested for CoNS (Pereira and others 2009; Podkowik and others 2012). In addition, it has been previously suggested that food-associated antimicrobial-resistant CoNS can be transferred to humans through food consumption. Furthermore, their antimicrobial resistance determinants may also be transferable to other commensal or potentially pathogenic bacteria in foodstuff, which is an idea supported by phylogenetic studies (Resch and others 2008; Podkowik and others 2012).

One idea that has been proposed is that resident CoNS species are reservoirs of antimicrobial-resistance genes because these bacteria are susceptible to the selective pressure imposed by both proper and abusive antimicrobial therapy in humans and animals (Iringer 2008). The *mecA* gene detection is considered to be the gold standard indicator to evaluate resistance to oxacillin (Anand and others 2009; John and others 2009), a penicillinase-resistant penicillin widely prescribed to treat staphylococcal infections (Zhang and others 2009). This gene is located on a genetic element, designated Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), which is inserted near the chromosomal origin of replication and can be easily transmitted among staphylococci (Sawant and others 2009). This study also showed that the *mecA* gene in CoNS that were isolated from milk shared sequence homology with SCC*mec*, similar to gene sequences observed in community-acquired oxacillin-resistant *S. aureus* (ORSA). In this study, the high percentage of *mecA*<sup>+</sup> CoNS was consistent with

previous data regarding both human and animal isolates (Secchi and others 2008; Zhang and others 2011).

Normanno and others (2007) suggested that raw milk pasteurization would eliminate the risk for consumers in acquiring infections related to methicillin or oxacillin-resistant *Staphylococcus*. However, in the current study, we verified that all of the milk used in cheese production was pasteurized in adherence with industrial quality control. Despite this treatment, CoNS were isolated from many industrialized soft cheese samples, and *mecA* was found in 81.5% of the CoNS isolated in this study. The oxacillin-resistant *mecA*-negative isolates might be associated with hyperproduction of  $\beta$ -lactamases that results in the hydrolysis of beta-lactam agents or even changes in penicillin binding proteins (PBPs) other than PBP2a (Secchi and others 2008). In contrast, oxacillin-susceptible CoNS and the presence of *mecA* might be associated with a mutated allele or even a decrease in environment-dependent expression (Ikonomidis and others 2008).

Chambers (1997) and Sawant and others (2009) showed that methicillin- or oxacillin-resistant staphylococci may be resistant to many other antimicrobials. With regards to penicillin, we are confident in our results using a penicillinase-susceptible  $\beta$ -lactam because all of the oxacillin-resistant bacteria were also resistant to penicillin. In the last few years, vancomycin use has dramatically increased, although no vancomycin resistance was observed among the CoNS isolates examined in this study. Recent data also did not report vancomycin-resistant staphylococci associated with cheese and raw milk samples (Wang and others 2012). Similarly, we have not found resistance against linezolid. Previous works indicate that this drug has been reserved due to the risk of bacterial resistance. The emergence of linezolid resistance in *Staphylococcus* spp. poses

significant challenges to the clinical treatment of infections caused by these organisms, especially in the case of CoNS (Fung and others 2001; Gu and others 2012). Finally, despite the common use of azithromycin for the treatment of *Staphylococci*-mediated bovine mastitis (Lucas and others 2010), our findings demonstrated a high drug sensitivity rate for azithromycin among all of the isolates examined in this study.

Gentamicin, tetracycline, fluoroquinolone and chloramphenicol resistance were also observed among CoNS isolates in this study. Aminoglycoside resistance is concerning because of the controlled use of this antimicrobial agent in the treatment of human and animal diseases (Sorum and L'Abée-Lund 2002; Kumar and others 2011). Others have also reported frequencies of tetracycline resistance among CoNS isolates similar to those observed in this study. The common use of this antimicrobial in both human and animal medicine, in addition to the use of similar animal growth promoters, could explain the occurrence of tetracycline-resistant CoNS in cheese samples (Teuber 2001; Resch and others 2008). The frequencies of fluoroquinolone and chloramphenicol resistance that we observed are in agreement with those reported in other studies conducted on *Staphylococci* isolated from foodstuff (Resch and others 2008; Podkowik and others 2012).

Overall, the high frequency of multidrug-resistant CoNS isolated from soft cheese in this study (MAR > 0.2) raises concerns and suggests the need for changes in sanitary regulation with regards to most of soft cheeses consumed in Brazil. One idea is that multidrug-resistant bacteria, particularly staphylococci associated with cheese samples, might be related to human contamination rather than contamination with animal origins (Spanu and others 2012). The antimicrobial susceptibility patterns observed for the CoNS isolates may reflect the microbial adaptive response to the use and overuse of antimicrobials.

## Conclusion

In conclusion, this study suggests that the handling of Minas soft cheese, even cheese of industrial origin, results in high CoNS counts. These bacteria are multidrug-resistant and may express virulence characteristics, such as the ability to form biofilms, hemolytic activity, and enterotoxin production. In this context, improving sanitation, quality control, and personnel education is essential to control the levels of undesirable bacteria in foodstuff. This study highlights the potential risks of bacterial persistence and the spread of neglected bacteria, as well as the presence of antimicrobial-resistance-related genetic markers throughout the food production chain and during food consumption.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Pos-Graduate Program in Health (PPGS/UFJF) and CAPES for the scholarship. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- Amador P, Fernandes R, Prudêncio C, Brito L. 2009. Resistance to  $\beta$ -lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *Int J Mol Sci* 10:1538–51.
- Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila R. 2009. Comparison of ceftazidime disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *meaA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol* 27:27–9.
- Araújo P, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. In: A. Méndez-Vilas, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz, Spain: Formatex Research Center. p 826–34.
- [ASM] American Society for Microbiology. 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. Report from the American Academy of Microbiology. Washington, DC: ASM.

- BRASIL. 2001. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.º 12: Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, Distrito Federal.
- BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa IN n.º 62: Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, Distrito Federal.
- BRASIL. 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Instrução Normativa IN n.º 04: Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo minas frescal. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, Distrito Federal.
- Carvalho JDG, Viotto WH, Kuayze AY. 2007. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological process. *Food Control* 18:262–7.
- Chambers HF. 1997. Methicillin/oxacillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10:781–91.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second information supplement M100-S22. Wayne, PA: CLSI.
- Coton E, Desmonts MH, Leroy S, Coton M, Jamet E, Christeaus S, Domizio PY, Lebert I, Talon R. 2010. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 137:221–9.
- Dionán RM. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33:1387–92.
- Fung HB, Kirschenbaum HL, Ojofemi BO. 2001. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. *Clin Ther* 23:356–91.
- Graff G, Rossetti L, Neviani E. 2000. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 42:175–84.
- Gu B, Kelesides T, Tsoutras S, Hindler J, Hümpfers RM. 2012. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* [Epub ahead of print].
- Ikononidis A, Michail G, Vasdeki A, Labrou M, Karavasili V, Stathopoulos C, Maniatis AN, Pournaras S. 2008. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *meaA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3905–8.
- Irlinger F. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* 126:302–10.
- John MA, Burden J, Stuart J, Reyes RC, Lanington R, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z. 2009. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. *J Antimicrob Chemother* 63:493–6.
- Krumperman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing *Escherichia coli* to identify risk sources of faecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46:165–70.
- Kumar R, Yadav BR, Singh RS. 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis: Sahiwal cattle. *J Biosci* 36:175–88.
- Loewen A, Loucares S, Bredal RG. 2004. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolate. *J Clin Microbiol* 42:3869–72.
- Lucas MF, Errecalde JO, Mestorino N. 2010. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Vet Pharmacol Ther* 33:132–40.
- Mullarky IR, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. 2001. *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* 69:45–51.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacchio AL, Virghilio S, Celano GV. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin. *Int J Food Microbiol* 117:219–22.
- Oliveira AM, Mira NFM, Sant'Ana AS, Ferreira JL. 2010. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. *J Food Sci* 75:M475–81.
- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol* 26:278–82.
- Piëte A, Verschraegen G. 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 134:45–54.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. 2004. Does the use of antimicrobials in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 53:28–52.
- Podkowik M, Bystron J, Banaj J. 2012. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathog Dis* 9:911–3.
- Pumbe L, Skilbeck CA, Wexler HM. 2008. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol* 56:412–9.
- Quiblier C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Berger-Bächi B, Senn MM. 2011. Contribution of SecDEF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. *BMC Microbiol* 11:72–84.
- Rall VLM, Störlein JM, Deus MFR, Sousa DC, Camargo CH, Godinho NC, Galindo LA, Soares TCS, Araújo Jr JP. 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. *Foodborne Pathog Dis* 7:1121–3.
- Resch M, Nagel V, Hertel C. 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int J Food Microbiol* 127:99–104.
- Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horst-Kottke MA, Knobloch JK, Zander AR, Mack D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 42:5614–9.
- Sowant AA, Gillespie BE, Oliver SP. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol* 134:73–81.
- Secchi C, Antunes ALS, Perez LRR, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. 2008. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. *Brazilian J Infect Dis* 12:316–20.
- Sinijoki H, Hyvönen P, Ferrer CP, Taponen S, Pyörälä S. 2012. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol* 158:344–52.
- Soarinho PSC, Faria CAM, Pinheiro JS, Almeida HG, Pires CV, Santos AS. 2012. Bacteriological quality of raw Milk used for production of a Brazilian farmstead raw milk cheese. *Foodborne Pathog Dis* 9:138–44.

- Sorum H, L'Abée-Lund TM. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol* 78:43–56.
- Spanu V, Spanu C, Viridis S, Cosu F, Scarano C, De Santis EPL. 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int J Food Microbiol* 153:53–7.
- Spanu V, Viridis S, Scarano C, Cosu F, De Santis EPL, Cosseddu AM. 2010. Antibiotic resistance assessment in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Vet Res Commun* 34:587–90.
- Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 4:493–9.
- Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Santos DA, Cerqueira MMOP, Cantini A, Nicolli JR, Jett M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis* 12:410–5.
- Wang HH, Mamazon M, Lehman M, Wan K, Luo H, Wittum TE, Yousef A, Bakaletz LO. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 254:226–31.
- Wang X, Meng J, Zhou T, Zhang Y, Yang B, Xi M, Sheng J, Zhi S, Xia X. 2012. Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from food and food animals. *Foodborne Pathog Dis* 9:95–101.
- Zhang Y, Agidi S, Lejeune JT. 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J Appl Microbiol* 107:1375–83.
- Zhang Y, Wang X, Lejeune JT, Zervos M, Bhargava K. 2011. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. *Res Vet Sci* 90:23–5.
- Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. 2004. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance, and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 42:4947–55.

**Apêndice B: Outras atividades acadêmico-científicas desenvolvidas no período 2009-2013:**

**Artigos publicados:**

JULIANA ALVES RESENDE, VÂNIA L. SILVA, CLÁUDIA OLIVEIRA FONTES, JOB ALVES SOUZA-FILHO, TAMARA LOPES ROCHA DE OLIVEIRA, CÍNTIA MARQUES COELHO, DIONÉIA EVANGELISTA CÉSAR, and CLÁUDIO GALUPPO DINIZ. **Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System. *Microbes Environ.* Vol. 27, No. 4, 449–455, 2012**

VÂNIA LÚCIA DA SILVA, NATÁLIA CÂNDIDO CAÇADOR, CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA, CLÁUDIA OLIVEIRA FONTES, GIZELE DUARTE GARCIA, JACQUES ROBERT NICOLI, and CLÁUDIO GALUPPO DINIZ. **Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant *Enterococci* in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil. *Microbes Environ.* Vol. 27, No. 2, 179–185, 2012**

**Publicação de trabalhos em eventos científicos:**

**- Internacionais**

Silva, CSF ; **FONTES, C.O.** ; GARCIA, G. D. ; CAÇADOR, N. C. ; BARBOSA, N. ; DINIZ, C.G. ; SILVA, V.L. . Antimicrobial susceptibility and metal/heavy metal tolerance patterns of *Enterococcus* recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil.. In: 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010, San Diego. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010.

**FONTES, C.O.** ; GARCIA, G. D. ; Silva, CSF ; BARBOSA, N. ; SILVA, V.L. ; DINIZ, C.G. . Occurrence of *Staphylococcus* strains harbouring *mecA* gene in industrial and home made soft white cheese.. In: 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010, San Diego. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010.

GARCIA, G. D. ; **FONTES, C.O.** ; Silva, CSF ; BARBOSA, N. ; DINIZ, C.G. ; SILVA, V.L. . Antagonistic activity of *Enterococcus* sp. Recovered from the Urban Pigeon (*Columba livia*) Feces in Juiz de Fora, Brazil. In: 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010, San Diego. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010.

**Nacionais**

**FONTES, C. O.** ; Silva, C.S.F. ; GARCIA, R. A. ; OLIVEIRA, T. L. R. ; SILVA, S. F. ; SILVA, Vânia Lúcia ; DINIZ, Cláudio Galuppo . Caracterização de *Staphylococcus* isolados de queijo Minas Frescal quanto a susceptibilidade a antimicrobianos e capacidade de formação de biofilmes experimentais. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu, Paraná. CD ROM do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

SILVA, S. F. ; **FONTES, C. O.** ; Diniz, Cláudio G. ; SILVA, Vânia Lúcia . Susceptibilidade a antimicrobianos e pesquisa de determinantes genéticos de resistência em bactérias do gênero *Staphylococcus* isolados de queijo Minas Frescal em Juiz de Fora, MG.. In: XVII Semana de Iniciação Científica da UFJF, 2011, Juiz de Fora/MG. CD ROM da XVII Semana de Iniciação Científica da UFJF, 2011.

**FONTES, C. O.** ; Da Silva, Vânia L. ; PAIVA, M. R. B. ; GARCIA, R. A. ; CASTRO, P. P. ; SILVA, S. F. ; Diniz, Cláudio G. . Ocorrência, resistência a antimicrobianos e características de virulência de estafilococos coagulase negativo portadores do gene *mecA* em queijo Minas Frescal. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos, São Paulo, Brasil. CD-ROM do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

### **Participação em eventos**

25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2009. (Congresso).

XX Congresso Latinoamericano de Microbiología y el IX Encuentro Nacional de Microbiólogos. 2010. (Congresso).

26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2011. (Congresso).

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012. (Congresso).

### **Atividades docentes:**

- Professora Substituta no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, no período de agosto de 2009 a julho de 2011. Disciplinas ministradas:

- ✓ Biologia de Microrganismos
- ✓ Bacteriologia
- ✓ Microbiologia I
- ✓ Microbiologia Geral
- ✓ Microbiologia Aplicada à Enfermagem

### **Participação em bancas de Pós-graduação *latu sensu* - Especialização:**

Participação em banca de Eliane Campos Resende. Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de representantes da família *Enterobacteriaceae* isolados de resíduos do serviço de saúde e domiciliares em Juiz de Fora. 2009. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Parasitologia, Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Participação em banca de Juliana Alves Resende. Avaliação do impacto da aquicultura na saúde humana, pela ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas resistentes à drogas antimicrobianas. 2010. Monografia

(Aperfeiçoamento/Especialização em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **Participação em bancas de trabalhos de conclusão de curso de graduação:**

Participação em banca de Isabelle Baião de Mello. Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* associados a infecções do trato urinário em laboratório de análises clínicas no município de Juiz de Fora - MG. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Participação em banca de Fabiane Beatriz Rodrigues da Silva. Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias associadas a infecções do trato urinário em laboratório de análises clínicas no município de Juiz de Fora/MG. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Participação em banca de Natália Cândido Caçador. Isolamento, identificação e perfil de susceptibilidade de linhagens do gênero *Enterococcus* isolados em fezes de pombos urbanos (*Columba livia*) em Juiz de Fora, MG.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Participação em banca de Rafaella Nogueira da Gama Mazzei. Resistência cruzada e implicações das concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos na morfologia de *Fusobacterium nucleatum* e na sua habilidade de formação de biofilme. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **Participação na orientação de alunos de graduação (Iniciação científica)**

Participação na orientação do Trabalho de Conclusão de Curso de Rafaela Alvim Garcia. Isolamento, identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal. 2012

Participação na orientação do Trabalho de Conclusão de Curso de Mayara Brandão. Perfil de susceptibilidade e características da virulência em *Staphylococcus* coagulase negativo isolados de queijo Minas Frescal. 2013.

## **ANEXOS**

### **Anexo A: Legislação relacionada ao queijo Minas Frescal**

**Ministério da Agricultura  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA**

**Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. (\*)**

**D.O.U. de 11/03/1996**

### **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**

#### **1. ALCANCE.**

##### **1.1. Objetivo**

Fixar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão possuir os queijos, com exceção dos Queijos Fundidos, Ralados, em Pó e Requeijão.

Sem prejuízo do estabelecimento no presente padrão, os padrões técnicos individuais poderão conter disposições em que sejam mais específicas e, em tais casos, aquelas disposições mais específicas se aplicarão à variedade individual ou aos grupos de variedade de queijos.

#### **2 - DESCRIÇÃO.**

##### **2.1. Definição**

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do calho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação.

Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

A denominação **QUEIJO** está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea.

## **2.2. Classificação.**

A seguinte classificação se aplicará a todos os queijos e não impede o estabelecimento de denominação e requisitos mais específicos, característicos de cada variedade de queijo que aparecerá, nos padrões individuais.

**2.2.1.** De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em percentagem, os queijos classificam-se em:

- Extra Gordo ou Duplo Creme: quando contenham o mínimo de 60%
- Gordos: quando contenham entre 45,0 e 59,9%
- Semigordo: quando contenham entre 25,0 e 44,9%
- Magros: quando contenham entre 10,0 e 24,9%
- Desnatados: quando contenham menos de 10,0%

**2.2.2.** De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classifica-se em:

- Queijo de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa dura): umidade de até **35,9%**.
- Queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa semidura): umidade entre 36,0 e 45,9%.
- Queijos de alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou “macios”): umidade entre 46,0 e 54,9%.
- Queijos de muita alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou “mole”): umidade não inferior a 55,0%.

**2.2.2.1.** Quando submetidos ou não a tratamento térmico logo após a fermentação, os queijos de muita alta umidade se classificarão em:

- Queijos de muita alta umidade tratados térmicamente.
- Queijos de muita alta umidade.

## **2.3. DESIGNAÇÃO (denominação de venda):**

Todos os produtos denominados **QUEIJO** incluirão o nome da variedade correspondente, sempre que responda às características da variedade de que trata, especificadas em um padrão individual.

O nome poderá ser acompanhado das denominações estabelecidas na classificação.

## **3. REFERÊNCIAS**

- Normas FIL 4A: 1982. Queijo e queijos processados.  
Determinação do conteúdo de sólidos totais( Métodos de referência).
- Norma FIL 5B: 1986. Queijo e Produtos Processados de Queijo.  
Conteúdo da Matéria Gorda.
- Norma FIL 50B: 1985. Leite e Produtos Lácteos – Métodos de Amostragem.
- Norma FIL 99A: 1987. Avaliação Sensorial de Produtos Lácteos.
- Norma A6: do Codex Alimentarius. Norma Geral para Queijo.
- Catálogo de Queijo. Documento FIL 141: 1981
- A.O.A.C. 15º Ed. 1990, 979.13, p.823.

#### **4. COMPOSIÇÃO E REQUISITOS.**

##### **4.1. Composição.**

##### **4.1.1. Ingredientes Obrigatórios.**

**4.1.1.1.** Leite e/ou Leite Reconstituído (integral), semidesnatado, desnatado e/ou soro lácteo.

Entende-se por leite o proveniente das espécies bovinas, caprina, ovina ou bubalina. Quando não existe uma referência específica, entende-se como leite da espécie bovina.

**4.1.1.2.** Coagulante apropriado (de natureza física e/ou química e/ou bacteriana e/ou enzimática).

##### **4.1.2. Ingredientes Opcionais.**

Cultivos de bactérias lácteas ou outros microorganismos específicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, caseína, caseinatos, sólidos de origem láctea, condimentos ou outros ingredientes opcionais permitidos somente conforme o previsto, explicitamente, nos padrões individuais definidos para variedade de queijo.

##### **4.2. Requisitos.**

**4.2.1.** Os queijos deverão obedecer aos requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade, estabelecidos no padrão individual correspondente.

**4.2.2.** Acondicionamento: poderão ser acondicionados ou não, e, dependendo da variedade de queijo de que se trata, apresentarão envases ou envoltórios bromatologicamente aptos recobrando a sua casca, aderindo ou não à mesma.

#### **5. ADITIVOS E COAJUVANTES E TECNOLOGIA OU ELABORAÇÃO.**

##### **5.1 Aditivos.**

Poderão ser utilizados na elaboração de queijos e aditivos relacionados na lista a que indica a classe de queijo para a qual ou as quais estão autorizadas. A utilização de outros aditivos poderá estar autorizada nos padrões individuais de certas variedades particulares de queijos.

<b>Nome</b>	<b>Função</b>	<b>Limite ( Max/conc)</b>	<b>Tipo de queijo</b>
Ácido cítrico	Regulador de Acidez	BPF	m.a.u.
Ácido láctico	Regulador de Acidez	BPF	m.a.u.
Ácido acético	Regulador de Acidez	BPF	m.a.u.
Aroma Natural de Defumado	Aromatizante	BPF	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Aromatizantes (exceto aroma de queijo e creme)	Aromatizante	BPF	m.a.u.
Nísina	Conservador	12,5 mg/kg	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio	Conservador	1000 mg/kg (em ácido sórbico)	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Nitrato de sódio ou potássio (isolados ou combinados)	Conservador	50 mg/kg (em nitrato de sódio)	m.u.; b.u.
Lisozima	Conservador	20 mg/L de leite	m.u.; b.u.
Natamicina	Conservador	1 mg/dm <sup>2</sup> 5 mg/kg só na superfície. Não detectável a 2 mm dos queijos cortados ou fatiados. Profundidade:	(só na superfície dos queijos cortados ou fatiados) m.a.u.b.

		ausência na massa	
Carotenóides Naturais, beta caroteno, bixina, nor bixina, urucum, annatto, rocu	Corante	10 mg/kg de queijo (como norbixina)	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Clorofila, clorofilina, clorofilina crúpica, sais de sódio e potássio	Corante	15 mg/kg de queijo (em clorofila)	a.u.; m.u.; b.u.
Curcuma, curcumina	Corante	BPF	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Carmim	Corante	BPF	m.a.u.
Betacaroteno Sintético (idêntico ao natural)	Corante	600 mg/kg de queijo	m.a.u.; a.u.; m.u.; b.u.
Riboflavina	Corante	BPF	---
Vermelho de Beterraba	Corante	BPF	---
Peróxido de Benzoila	Corante	20 mg/L de leite	a.u.; m.u.; b.u.
Dióxido de Titânio	Corante	BPF	a.u.; m.u.; b.u.
Carboximetilcelulose	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Carragenina	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Goma Guar	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Goma de Algaroba	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Goma Xantana	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Goma Karaya	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Goma Arábica	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Agar	Espessante/	5g/kg de queijo	m.a.u.

	Estabilizante		
Ácido Algímico, seus sais de amônio, cálcio e sódio, e alginato de propilenoglicol	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Pectina ou Pectina Amidada	Espessante/ Estabilizante	5g/kg de queijo	m.a.u.
Alginato de Potássio	Espessant / Estabilizante	500 mg/kg de queijo	m.a.u.
Amido Modificado	Espessante/ Estabilizante	BPF	m.a.u.
Lípases	Agente de Maturação	BPF	m.u.; b.u.
Proteases	Agente de Maturação	BPF	b.u.

(\*) m.a.u. Queijos de muita alta umidade

a.u. Queijos de alta umidade

m.u. Queijos de média umidade

b.u . Queijos de baixa umidade

(\*\*) Queijos de mais alta umidade tratados termicamente.

## 5.2. Coadjuvantes de Tecnologia ou Elaboração.

Poderão ser utilizados na elaboração dos queijos de muita alta umidade tratados termicamente os coadjuvantes de tecnologia indicados a seguir:

## 6. CONTAMINANTES.

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem esta presente em quantidades superiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente.

## 7. HIGIENE.

### 7.1. Considerações Gerais.

As práticas de higiene para elaboração do produto estarão de acordo com o estabelecimento no Código Internacional Recomendado de Práticas Gerais de Higiene dos Alimentos.

( CAC/VOL A.1985).

O leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meio mecânicos e submetidos à pasteurização ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase residual negativa (A.O.A.C. 15º Ed. 1990, 979. 13, p.823) combinado ou não com outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto.

Fica excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5º C, durante um tempo não inferior a 60 dias.

## **7.2. Critérios macroscópicos**

O produto não deverá conter substâncias estranhas de qualquer natureza.

## **7.3. Critérios microscópicos**

O produto não deverá apresentar substâncias microscópicas estranhas de qualquer natureza.

## **7.4. Critérios Microbiológicos.**

Os queijos deverão obedecer ao estabelecido na legislação específica.

## **8. PESOS E MEDIDAS.**

Será aplicada a legislação específica.

## **9. ROTULAGEM.**

Será aplicada a legislação específica.

Será denominado “Queijo...” seguido da variedade ou nome de fantasia, se existir, de acordo com o padrão individual que corresponda às características da variedade de queijo.

Padrão individual que corresponda às características da variedade de queijo.

Poderão incluir-se denominações estabelecidas na classificação.

Nos queijos com adição de substâncias alimentícias, condimentos ou outras substâncias aromatizantes naturais, deverá indicar-se na denominação de venda o nome da ou das adições principais, exceto no caso dos queijos em que a presença destas substâncias constitua uma característica tradicional.

No caso do, emprego de leites de mais de uma espécie animal, deverá ser declarado na lista de ingredientes os leites das diferentes espécies e seu percentual relativo.

## **10. MÉTODOS DE ANÁLISES.**

Umidade: FIL 4A: 1982

Matéria Gordas: FIL 5B: 1986

## **11. AMOSTRAGEM**

Serão seguidos os procedimentos recomendados na Norma FIL 50B: 1985.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA  
AGRÁRIA.  
GABINETE DO MINISTRO.

### **PORTARIA Nº 146 DE 07 DE MARÇO DE 1996.**

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA, no uso da atribuição que lhe confere a Art. 87, II, da Constituição da República, e que nos termos do disposto no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962, alterado pelo Decreto nº 1.812 de 08 de fevereiro de 1996 e

Considerando as Resoluções Mercosul/GMC números 69/93, 70/93, 71/93, 72/93, 82/93, 16/94, 43/94, 63/94, 76/94, 78/94 e 79/94 que aprovam os Regulamentos Técnicos de Identidades e Qualidades de Produtos Lácteos;

Considerando a necessidade de Padronização dos Métodos de Elaboração dos Produtos de Origem Animal no Tocante aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidades de Produtos Lácteos, Resolve;

Art. 1º Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos em anexo.

Art. 2º Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidades dos Produtos Lácteos aprovados por esta Portaria, estarão disponíveis na Coordenação de Informação Documental Agrícola, da Secretária de Documental Agrícola, da Secretaria do Desenvolvimento Rural do Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor 60 (sessenta) dias após a data de sua publicação.

JOSÉ EDUARDO DE ANDRADE VIEIRA

## **REGULAMENTO TÉCNICO GERAL PARA A FIXAÇÃO DOS REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE QUEIJOS**

### **1. ALCANCE**

#### **1.1. Objetivo**

Fixar os requisitos microbiológicos que deverão obedecer os queijos.

## 2. DEFINIÇÃO

Os requisitos microbiológicos definidos nesta norma foram estabelecidos de acordo com critérios e planos de amostragem para aceitação de lotes da Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas dos Alimentos. **(I.C.M.S.F.)**.

Os métodos analíticos especificados respondem à metodologia internacionalmente aceita.

Os queijos foram classificados segundo o conteúdo de umidade da massa, outras características próprias e tecnologias de fabricação.

## 3. REQUISITOS

### 3.1. Queijos de baixa umidade (umidade menor que 36%)

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=2 m=200 M=1.000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=100 M=500	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985

### 3.2. Queijos de média umidade (36% < umidade < 46%)

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=2 m=1.000 M=5.000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=100 M=500	5	APHA 1992, cap. 24 (1)

Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

### 3.3. Queijo de alta umidade (46% < umidade < 55%), excetuando os Queijos Quartiolo, Cremoso, Criolo e Minas Frescal

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=2 m=5.000 M=10.000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=1.000 M=5.000	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

### 3.4. Queijos Quartiolo, Cremoso, Criolo e Minas Frescal (46% < umidade < 55%)

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=2 m=10.000 M=100.000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=1.000 M=5.000	5	APHA 1992, cap. 24 (1)

Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

### 3.5. Queijos de muito alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundantes (umidade > 55%)

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=3 m=100 M=1.000	4	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=10 M=100	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=10 M=100	5	FIL 145: 1990
Fungos e Leveduras /g	n=5 c=2 m=500 M=5.000	2	FIL 94B: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

### 3.6. Queijos de mais alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundantes (umidade > 55%)

MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.F.S.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes a 30°C	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 73A: 1985

Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=50 M=500	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=1 m=100 M=500	8	FIL 145: 1990
Fungos e Leveduras /g	n=5 c=2 m=500 M=5.000	2	FIL 94B: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

### 3.7. Queijos Ralado

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO</b>	<b>CATEGORIA I.C.M.F.S.</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISE</b>
Coliformes a 30°C	n=5 c=3 m=200 M=1.000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990
Fungos e Leveduras /g	n=5 c=2 m=500 M=5.000	5	FIL 94B: 1990
Salmonela sp /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985

### 3.8. Queijos Fundidos ou Reelaborados e Queijos Processados por UHT ou UAT

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO</b>	<b>CATEGORIA I.C.M.F.S.</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISE</b>
Coliformes a 30°C	n=5 c=3 m=10	5	FIL 73A: 1985

	M=100		
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m<3 M=10	5	APHA 1992, cap. 24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1.000	5	FIL 145: 1990

## Anexo B: Valores de breakpoint para interpretação do perfil de suscetibilidade a drogas (Concentração Inibitória Mínima) para *Staphylococcus* sp.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>PENICILLINS</b>									
<p>(9) Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheims, and carbapenems approved for use by the FDA for staphylococcal infections. Penicillin-resistant, oxacillin-susceptible strains are resistant to penicillinase-labile penicillins but susceptible to other penicillinase-stable penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, relevant cepheims, and carbapenems. Oxacillin-resistant staphylococci are resistant to all currently available β-lactam antimicrobial agents with the exception of the newer cephalosporins with anti-MRSA activity. Thus, susceptibility or resistance to a wide array of β-lactam antimicrobial agents may be deduced from testing only penicillin and either ceftiofloxacin or oxacillin. Routine testing of other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheims, or carbapenems is not advised.</p> <p>(10) If a penicillinase-stable penicillin is tested, oxacillin is the preferred agent and results can be applied to the other penicillinase-stable penicillins, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, methicillin, and nafcillin.</p> <p>See comment (4).</p>									
A	Penicillin	10 units	≥ 29	–	≤ 28	≤ 0.12	–	≥ 0.25	(11) Penicillin-resistant strains of staphylococci produce β-lactamase, and the testing of penicillin instead of ampicillin is preferred. Penicillin should be used to test the susceptibility of all staphylococci to all penicillinase-labile penicillins, such as ampicillin, amoxicillin, azlocillin, carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, and ticarcillin. An induced β-lactamase test should be performed on staphylococcal isolates with penicillin MICs ≤ 0.12 µg/mL or zone diameters ≥ 29 mm before reporting the isolate as penicillin susceptible. However, the prevalence of penicillin-susceptible <i>S. aureus</i> strains is low. Isolates that test as susceptible to penicillin may still produce β-lactamase, which is usually detected by an induced β-lactamase test. Occasional isolates are not detected by induced β-lactamase testing. Thus, for serious infections, laboratories should consider performing MIC tests for penicillin and testing for induced β-lactamase production on subsequent isolates from the same patient. A positive β-lactamase test predicts resistance to penicillin, ampicillin, amoxicillin, carbenicillin, ticarcillin, mezlocillin, and piperacillin. For oxacillin-resistant staphylococci, report penicillin as resistant or do not report. See Supplemental Table 2C-S3 and Table 2C-S4 at the end of Table 2C.
A	Oxacillin For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> .	1 µg oxacillin 1 µg oxacillin 30 µg ceftiofloxacin	≥ 13	11-12	≤ 10	≤ 2 (oxacillin)	–	≥ 4 (oxacillin)	For <i>S. aureus</i> .  For <i>S. lugdunensis</i> .  For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> .  (12) Ceftiofloxacin is used as a surrogate for oxacillin resistance; report oxacillin susceptible or resistant based on the ceftiofloxacin result. If both ceftiofloxacin and oxacillin are tested against <i>S. aureus</i> or <i>S. lugdunensis</i> and either result is resistant, the organism should be reported as oxacillin resistant.  See comment (9).

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
A	Oxacillin For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> .	1 µg oxacillin	–	–	–	≤ 0.25 (oxacillin)	–	≥ 0.5 (oxacillin)	For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> .  (13) Oxacillin interpretive criteria may overcall resistance for some coagulase-negative staphylococci because some non- <i>S. epidermidis</i> strains for which the oxacillin MICs are 0.5 to 2 µg/mL lack <i>mecA</i> . For serious infections with coagulase-negative staphylococci other than <i>S. epidermidis</i> , testing for <i>mecA</i> or for PBP 2a or with cefoxitin disk diffusion may be appropriate for strains for which the oxacillin MICs are 0.5 to 2 µg/mL.
		30 µg cefoxitin	≥ 25	–	≤ 24	–	–	–	See comment (12). See comment (9).

## Anexo B – Continuação...

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>PENICILLINS (Continued)</b>									
O	Ampicillin	10 µg	≥ 29	–	≤ 28	≤ 0.25	–	≥ 0.5	(14) Class representative for ampicillin and amoxicillin. (15) For oxacillin-resistant staphylococci, report ampicillin as resistant or do not report.
O	Methicillin	5 µg	≥ 14	10–13	≤ 9	≤ 8	–	≥ 16	(16) For use with <i>S. aureus</i> only.
O	Nafcillin	1 µg	≥ 13	11–12	≤ 10	≤ 2	–	≥ 4	See comment (16).
<b>β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS</b>									
(17) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.									
See comments (4) and (9).									
O	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥ 20	–	≤ 19	≤ 4/2	–	≥ 8/4	
O	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥ 15	12–14	≤ 11	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
O	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥ 18	–	≤ 17	≤ 8/4	–	≥ 16/4	
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	≥ 23	–	≤ 22	≤ 8/2	–	≥ 16/2	
<b>CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I)</b>									
See comment (17).									
See comments (4) and (9).									
O	Cefamandole	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefazolin	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefepime	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefmetazole	30 µg	≥ 16	13–15	≤ 12	≤ 16	32	≥ 64	
O	Cefonicid	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefoperazone	75 µg	≥ 21	16–20	≤ 15	≤ 16	32	≥ 64	
O	Cefotaxime	30 µg	≥ 23	15–22	≤ 14	≤ 8	16–32	≥ 64	
O	Cefotetan	30 µg	≥ 16	13–15	≤ 12	≤ 16	32	≥ 64	
O	Ceftazidime	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Ceftizoxime	30 µg	≥ 20	15–19	≤ 14	≤ 8	16–32	≥ 64	
O	Ceftriaxone	30 µg	≥ 21	14–20	≤ 13	≤ 8	16–32	≥ 64	
O	Cefuroxime (parenteral)	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cephalothin	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Moxalactam	30 µg	≥ 23	15–22	≤ 14	≤ 8	16–32	≥ 64	

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>CARBAPENEMS</b>									
See comment (17). See comments (4) and (9).									
O	Ertapenem	10 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8	
O	Imipenem	10 µg	≥ 16	14–15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16	
O	Meropenem	10 µg	≥ 16	14–15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16	
<b>GLYCOPEPTIDES</b>									
B	Vancomycin	–	–	–	–	≤ 2	4–8	≥ 16	For <i>S. aureus</i> .  (18) MIC tests should be performed to determine the susceptibility of all isolates of staphylococci to vancomycin. The disk test does not differentiate vancomycin-susceptible isolates of <i>S. aureus</i> from vancomycin-intermediate isolates, nor does the test differentiate among vancomycin-susceptible, intermediate, and resistant isolates of coagulase-negative staphylococci, all of which will give similar size zones of inhibition.  (19) The vancomycin 30-µg disk test detects <i>S. aureus</i> isolates containing the <i>vanA</i> vancomycin resistance gene (VRSA). Such isolates will show no zone of inhibition around the disk (zone = 6 mm). The identification of isolates showing no zone of inhibition should be confirmed. Isolates of staphylococci producing vancomycin zones of ≥ 7 mm should not be reported as susceptible without performing a vancomycin MIC test.  (20) Send any <i>S. aureus</i> for which the vancomycin is ≥ 8 µg/mL to a reference laboratory.  (21) Disk testing is not reliable for testing vancomycin.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>GLYCOPEPTIDES (Continued)</b>									
B	Vancomycin	–	–	–	–	≤ 4	8–16	≥ 32	For coagulase-negative staphylococci. See comments (18) and (21). (22) Send any coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> for which the vancomycin MIC is ≥ 32 µg/mL to a reference laboratory. See also Section 12.1.3 in M07-A8 and Section 11.1.3 in M02-A10.
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≥ 14	11–13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32	(23) Teicoplanin disk diffusion interpretive criteria were not reevaluated concurrent with the reevaluation of vancomycin disk diffusion interpretive criteria during recent studies. Therefore, the ability of these teicoplanin intermediate and teicoplanin-resistant staphylococci from teicoplanin-susceptible strains is not known.
<b>LIPOPEPTIDES</b>									
B	Daptomycin	–	–	–	–	≤ 1	–	–	(24) Disk testing is not reliable for testing daptomycin. See comment (7).
<b>AMINOGLYCOSIDES</b>									
C	Gentamicin	10 µg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
O	Amikacin	30 µg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64	
O	Kanamycin	30 µg	≥ 18	14–17	≤ 13	≤ 16	32	≥ 64	
O	Netilmicin	30 µg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32	
O	Tobramycin	10 µg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
<b>MACROLIDES</b>									
(25) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.									
A	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	15 µg	≥ 18	14–17	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8	
A		15 µg	≥ 18	14–17	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8	
A		15 µg	≥ 23	14–22	≤ 13	≤ 0.5	1–4	≥ 8	
O	Dirithromycin	15 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8	
<b>KETOLIDES</b>									
B	Tellithromycin	15 µg	≥ 22	19–21	≤ 18	≤ 1	2	≥ 4	

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>TETRACYCLINES</b>									
(26) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
B	Tetracycline	30 µg	≥ 19	15–18	≤ 14	≤ 4	8	≥ 16	
B	Doxycycline	30 µg	≥ 16	13–15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
O	Minocycline	30 µg	≥ 19	15–18	≤ 14	≤ 4	8	≥ 16	
<b>FLUOROQUINOLONES</b>									
(27) <i>Staphylococcus</i> spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.									
C	Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin	5 µg	≥ 21	16–20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
C		5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
C		5 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 1	2	≥ 4	
C	Moxifloxacin	5 µg	≥ 24	21–23	≤ 20	≤ 0.5	1	≥ 2	
U	Lomefloxacin	10 µg	≥ 22	19–21	≤ 18	≤ 2	4	≥ 8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥ 17	13–16	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
O	Enoxacin	10 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 2	4	≥ 8	(28) FDA approved for <i>S. saprophyticus</i> and <i>S. epidermidis</i> (but not for <i>S. aureus</i> ).
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 23	20–22	≤ 19	≤ 0.5	1	≥ 2	
O	Grepafloxacin	5 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 1	2	≥ 4	
O	Sparfloxacin	5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 0.5	1	≥ 2	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8	

Anexo B – Continuação...

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>NITROFURANTOINS</b>									
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 32	64	≥ 128	
<b>LINCOSAMIDES</b>									
A	Clindamycin	2 µg	≥ 21	15–20	≤ 14	≤ 0.5	1–2	≥ 4	(29) Inducible clindamycin resistance can be detected by disk diffusion using the D-zone test and by broth microdilution using a single well containing a combination of erythromycin and clindamycin. See <b>Supplemental Tables 2C-S3 and 2C-S4</b> , Section 12 in M02-A10, and Section 13 in M07-A8 for current recommendations.  See comment (25).
<b>FOLATE PATHWAY INHIBITORS</b>									
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥ 16	11–15	≤ 10	≤ 2/38	–	≥ 4/76	
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥ 17	13–16	≤ 12	≤ 256	–	≥ 512	(30) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥ 16	11–15	≤ 10	≤ 8	–	≥ 16	
<b>PHENICOLS</b>									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥ 18	13–17	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32	See comment (25).
<b>ANSAMYCINS</b>									
B	Rifampin	5 µg	≥ 20	17–19	≤ 16	≤ 1	2	≥ 4	(31) <i>Rx</i> : Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.
<b>STREPTOGRAMINS</b>									
C	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥ 19	16–18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	(32) For reporting against methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> .
<b>OXAZOLIDINONES</b>									
B	Linezolid	30 µg	≥ 21	–	≤ 20	≤ 4	–	≥ 8	(33) When testing linezolid, disk diffusion zones should be examined using transmitted light. Organisms with resistant results by disk diffusion should be confirmed using an MIC method.