

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

**Ana Caroline Lopes de Paula**

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA, RESISTOMA  
CLÍNICO E OCORRÊNCIA DE INTEGRONS NO METAGENOMA  
OBTIDO DE QUEIJOS MINAS FRESCAL INDUSTRIALIZADOS**

Juiz de Fora

2018

**ANA CAROLINE LOPES DE PAULA**

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA, RESISTOMA  
CLÍNICO E OCORRÊNCIA DE INTEGRONS NO METAGENOMA  
OBTIDO DE QUEIJOS MINAS FRESVAL INDUSTRIALIZADOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**ORIENTAÇÃO**

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (Orientador)**  
**Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva (Co-orientadora)**  
**Dra. Julliane Dutra Medeiros (Co-orientadora)**

Juiz de Fora

2018

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

Paula, Ana Caroline Lopes de.

Estrutura da comunidade bacteriana, resistoma clínico e ocorrência de integrons no metagenoma obtido de queijos Minas Frescal industrializados / Ana Caroline Lopes de Paula. -- 2018.  
100 p. : il.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadores: Vânia Lúcia da Silva, Julliane Dutra Medeiros

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. Queijo Minas Frescal. 2. DNA fingerprint. 3. Comunidade bacteriana. 4. Resistoma. 5. Integron. I. Diniz, Cláudio Galuppo , orient. II. Silva, Vânia Lúcia da, coorient. III. Medeiros, Julliane Dutra, coorient. IV. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, dono de tudo o que tenho e sou, por fazer infinitamente mais do que eu poderia pedir, pensar ou sonhar. Obrigada por seu amor incondicional, por ter me fortalecido e sustentado cada dia, por ter sido o meu descanso nos dias difíceis. A Ele seja toda a honra e toda a glória!

Aos meus pais, Francisco e Vânia, minha eterna gratidão por tudo o que fizeram por mim. Obrigada por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Obrigada por torcerem tanto pela minha felicidade e pelo meu sucesso. Eu amo muito vocês!

Ao Rafael, meu noivo, pelo carinho, paciência, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Obrigada por compartilhar comigo os momentos de choro e lutas e os momentos de conquistas e vitórias. Obrigada por me fazer tão bem.

Ao meu orientador Cláudio, e minha co-orientadora Vânia, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, por terem confiado a mim este trabalho e por cada conhecimento compartilhado. Obrigada porque mesmo sem me conhecer, acreditaram em mim e me receberam tão bem.

À Analice e minha co-orientadora Julliane, por cada ensinamento, por cada palavra de incentivo, pela paciência, por cada pergunta respondida. Obrigada porque vocês fizeram parte diretamente da minha evolução e do meu amadurecimento não apenas científico e profissional, mas também pessoal. Sem dúvidas, vocês foram peças fundamentais para essa conquista.

Às queridas companheiras que o mestrado colocou em minha vida, Michelle (minha companheira de luta desde o início e dupla de trabalhos) Thelma e Thais, pelo convívio durante esses anos, por compartilharem os problemas enfrentados durante o desenvolvimento desse trabalho e por vibrarem com as vitórias alcançadas.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório, que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução desse trabalho.

À todos os demais companheiros de laboratório, por toda ajuda e pelo convívio harmonioso durante esses anos.

À todos os meus amigos, por estarem ao meu lado em todos os momentos e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro, que tornou possível a realização desse trabalho.

“Não somos o que gostaríamos de ser.  
Não somos o que ainda iremos ser  
Mas, graças a Deus,  
Não somos mais quem nós éramos”

Martin Luther King

## RESUMO

O queijo Minas Frescal (QMF) representa um dos queijos mais consumidos no Brasil. Diversos fatores do seu processamento influenciam suas características microbiológicas, e conseqüentemente, sua qualidade e propriedades organolépticas. Seu alto teor de umidade e os riscos de contaminação durante a cadeia produtiva favorecem a ocorrência de microrganismos contaminantes, muitas vezes apresentando resistência aos antimicrobianos. Dessa forma, do ponto de vista da segurança alimentar e frente ao crescente fenômeno da resistência bacteriana às drogas, torna-se importante a investigação sobre a estrutura da comunidade bacteriana em QMF, bem como a avaliação da ocorrência de marcadores genéticos microbianos relacionados à resistência a drogas e seu potencial de mobilização. Neste estudo foram obtidas 5 amostras de um mesmo lote de 7 marcas de QMF identificadas de A a G, totalizando 35 amostras. Após a extração de DNA total microbiano das amostras, foram utilizadas abordagens de DNA *fingerprint*, pela amplificação de sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (rep-PCR) para avaliação comparativa da similaridade da estrutura global da comunidade bacteriana. Posteriormente, PCR-DGGE foi utilizada para avaliar o perfil e a riqueza das amostras com relação a grupos de bactérias lácticas. Matrizes de similaridade foram obtidas utilizando o método de agrupamento UPGMA. Os resultados obtidos pela técnica de rep-PCR revelaram que as amostras de queijos foram claramente agrupadas de acordo com as suas respectivas marcas. Além disso, perfis semelhantes entre amostras de marcas diferentes foram observados, indicando a presença de um núcleo microbiano comum. As amostras avaliadas também foram agrupadas de acordo com suas respectivas marcas de fabricação de acordo com os padrões de DGGE obtidos para bactérias lácticas. A elevada similaridade entre a maioria das amostras do mesmo lote obtida nas técnicas de *fingerprint* sugere a reprodutibilidade e aplicabilidade das técnicas, e controle no processamento dos queijos ao longo da cadeia produtiva. Para a avaliação do resistoma clínico, a presença de 40 marcadores de resistência a diferentes classes de antibióticos foi avaliada por reação de PCR. Um núcleo comum de marcadores genéticos em todas as marcas foi detectado, associado à resistência aos beta-lactâmicos, tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas. Outros marcadores, incluindo aqueles relacionados a bombas de efluxo e resistência aos aminoglicosídeos, também foram observados. Integrons de classes 1 e 2 foram detectados, respectivamente, em 77% e 97% das amostras. As diferentes amostras de QMF puderam ser agrupadas de acordo com seu perfil de marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos, o que sugere epidemiologia peculiar que pode estar relacionada a qualidade e aos níveis de contaminação dos queijos ao longo da cadeia produtiva. Em conjunto, os dados sugerem que embora a cadeia produtiva do QMF seja controlada na indústria, riscos sanitários são inerentes pela contaminação dos queijos por bactérias putativas resistentes a antimicrobianos. Como um todo, os dados apontam para a necessidade de discussão dos parâmetros de qualidade microbiológica na produção, armazenamento e distribuição de QMF. Além disso, a detecção de integrons de classe 1 e 2 levanta questões a respeito do potencial de transferência horizontal de genes de resistência para a microbiota humana através do consumo destes alimentos.

**Palavras chaves:** Queijo Minas Frescal; DNA *fingerprint*; Comunidade Bacteriana; Resistoma; Integron

## ABSTRACT

Minas Frescal cheese (QMF) represents one of the most consumed cheeses in the country. Several factors of its processing influence its microbiological characteristics, and, consequently, its quality and properties. Its high moisture content and the risks of contamination during the production chain favor the occurrence of contaminating microorganisms, often presenting antimicrobial resistance. Thus, from the point of view of food safety and the growing phenomenon of bacterial resistance to drugs, it is important to investigate the structure of the bacterial community in Minas Frescal cheese, as well as the evaluation of the occurrence of microbial genetic markers related to drug resistance and its potential for mobilization. In this study 5 samples from the same batch of 7 brands of Minas Frescal cheeses were identified from A to G, totaling 35 samples. After the extraction of total DNA from the samples, DNA fingerprint approaches were used, by the amplification of repetitive extragenic palindromic sequences (rep-PCR) to evaluate the similarity of the global structure of the bacterial community. Afterwards, PCR-DGGE was used to evaluate the profile and richness of the samples in relation to groups of lactic bacteria. Similarity matrices were obtained using the UPGMA clustering method. The results obtained by the rep-PCR technique revealed that the cheese samples were clearly brand-clustered. In addition, similar profiles among samples of different brands were observed, indicating the presence of a common microbial nucleus. The evaluated samples were also separated according to their respective manufacturing brands by the DGGE for lactic acid bacteria. The high similarity among the majority of the samples from the same batch obtained in the fingerprint techniques suggests the reproducibility and applicability of the techniques, and control in the cheese processing along the production chain. For the evaluation of clinical resistance, the presence of resistance markers to different classes of antibiotics was evaluated by PCR reaction. A common core of genetic markers was detected, associated with resistance to beta-lactams, tetracyclines, quinolones and sulfonamides. Other markers, including those related to efflux pumps and aminoglycoside resistance, have also been observed, but not in all brands. Integrons of classes 1 and 2 were detected, respectively, in 77% and 97% of the samples. The different QMF samples could be grouped according to their profile of genetic markers of antimicrobial resistance, which suggests peculiar epidemiology that may be related to the quality and levels of contamination of the cheeses along the production chain. Taken together, the data suggest that although the productive chain of QMF is controlled in the industry, health risks are inherent in the contamination of cheeses by putative antimicrobial resistant bacteria. As a whole, the data point to the need to discuss the parameters of microbiological quality in the production, storage and distribution of QMF. In addition, the detection of class 1 and 2 integrons raises questions about the potential for horizontal transfer of resistance genes to the human microbiota through the consumption of these foods.

**Keywords:** Minas Frescal Cheese; DNA fingerprint; Bacterial Community; Resistome; Integron



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes de resistência encontrados em isolados bacterianos de produtos lácteos.....	31
Tabela 2. Sequência dos primers usados para amplificar fragmentos de genes DNAr 16S.....	40
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanhos dos fragmentos esperados e referências.....	43
Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados da variável riqueza para grupos de bactérias lácticas.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal.....	18
Figura 2. Estrutura do Integron e mecanismo de captura de genes.....	28
Figura 3. Esquema do gene RNAr 16S bacteriano.....	33
Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental.....	37
Figura 5. <i>Fingerprint</i> obtido após amplificação de fragmentos do genoma bacteriano por rep-PCR a partir do DNA genômico extraído das amostras de queijos.....	48
Figura 6. Dendrograma obtido pela análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do genoma bacteriano amplificados por rep-PCR a partir do DNA genômico extraído das amostras de queijos.....	48
Figura 7. DGGE <i>fingerprint</i> e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano DNAr 16S específicos para o grupo de bactérias lácticas amplificados a partir do DNA metagenômico extraído das amostras de queijos.....	50
Figura 8. Frequência de detecção dos marcadores genéticos de resistência.....	52
Figura 9. Perfil de ocorrência dos marcadores genéticos de resistência e integrons entre as marcas de queijos.....	53
Figura 10. Agrupamento das amostras de queijo baseado na ocorrência dos marcadores genéticos de resistência, utilizando uma análise de componente principal (PCA).....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAL- Bactérias do ácido láctico

DGGE- *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DNA- *Deoxyribonucleic Acid*

DTA- Doenças transmitidas por alimentos

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul

MLS- Macrolídeos, lincosamida e estreptogramina

ORF- *Open reading frames*

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RNA<sub>m</sub>- RNA mensageiro

RNA<sub>r</sub>- RNA ribossômico

RNA16s- RNA ribossômico 16s

REP- *Repetitive Extragenic Palindromic*

TAE- Tris-Acetato-EDTA

TE- Tris-EDTA

TEMED- *N,N,N',N'*- tetrametiletileno diamino

TBE- Tris-Borato-EDTA

UV- Ultra Violeta

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1 Queijo Minas Frescal .....	15
2.1.1. Cadeia produtiva do Queijo Minas Frescal: implicações na sua microbiota .....	17
2.2 Fenômeno da resistência aos antimicrobianos .....	22
2.2.1 Aspectos gerais da antibioticoterapia .....	22
2.2.2 Resistoma .....	24
2.2.3 Integrons .....	27
2.2.4 Alimentos como potenciais reservatórios de genes de resistência .....	29
2.3 Abordagens contemporâneas para o estudo da microbiota de queijos.....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 Objetivo Geral .....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 Delineamento Experimental .....	37
4.2 Processamento das amostras e extração do DNA.....	38
4.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana dos queijos por técnicas de fingerprint .....	39
4.3.1 Rep-PCR .....	39
4.3.2 PCR-DGGE para o grupo de bactérias lácticas.....	40
4.3.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante .....	41
4.4 Detecção dos genes de resistência e integrons.....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	47
5.1 Avaliação comparativa da similaridade da estrutura global da comunidade bacteriana por rep-PCR .....	47
5.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	49
5.3 Detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos.....	51
<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>ANEXO A</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O queijo Minas Frescal é caracterizado por ser um produto tipicamente brasileiro, sendo um dos queijos mais consumidos no país. Sua produção é realizada de forma industrial ou artesanal, pela coagulação enzimática de leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, com o uso ou não de bactérias lácticas. É caracterizado por ser um queijo do tipo fresco não maturado, de muito alta umidade e pH maior que 5,0.

Sabe-se que a qualidade e as propriedades dos queijos Minas estão diretamente relacionadas a sua microbiota, cuja composição e características são influenciadas por diversos fatores, tais como o tipo de tratamento do leite utilizado como matéria prima; as práticas de higiene durante a ordenha e fabricação; a época e a forma de processamento do produto, que pode variar de acordo com cada região; as condições e o tempo de armazenamento. Essas variações podem conferir a cada queijo um perfil microbiano diferente, e conseqüentemente, resultar em características sensoriais diferenciadas e peculiares. Portanto, o conhecimento sobre a estrutura da comunidade microbiana do queijo Minas Frescal pode ser considerado uma ferramenta útil para o estudo da sua diversidade, identidade e qualidade.

As bactérias lácticas desempenham um papel importante na fabricação de queijos Minas Frescal. O ácido láctico resultante do seu metabolismo reduz o pH, melhorando a atividade de coagulação e tornando o queijo menos propício ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. As características próprias do queijo Minas Frescal, como sua elevada umidade, somadas aos riscos de contaminação durante sua cadeia produtiva, o tornam um meio propício à ocorrência de microrganismos contaminantes e potencialmente patogênicos, afetando a sua durabilidade, qualidade e segurança microbiológica.

A contaminação dos alimentos em geral por microrganismos resistentes aos antimicrobianos tem sido alvo de atenção, pois a contenção do fenômeno da resistência representa um grande desafio para a saúde pública. A situação é ainda mais preocupante à medida que os alimentos podem tornar-se reservatório de genes mobilizáveis de resistência a drogas antimicrobianas, podendo ser transferidos para a microbiota intestinal humana. Essa transferência, muitas vezes denominada mobilidade gênica, pode estar relacionada, nestes ecossistemas, a elementos

genéticos denominados integrons. Os integrons são plataformas que ajudam na integração e expressão de genes móveis sem promotores, designados cassetes gênicos. Genes que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos são encontrados nos integrons na forma de cassetes gênicos. Os integrons podem ser classificados em cinco classes, sendo que os tipos mais relacionados com genes de resistência são os integrons de classe 1 (*intl1*), 2 (*intl2*) e 3 (*intl3*).

Considerando-se o seu valor cultural e sua disponibilidade, além de aspectos relacionados à sua riqueza nutricional como substrato para desenvolvimento microbiano associado ao processo de produção, os alimentos lácteos, especialmente os queijos, tem sido destacados como possíveis reservatórios de microrganismos putativos resistentes a drogas antimicrobianas. No contexto da crescente e preocupante resistência a drogas antimicrobianas, foi proposta a designação de resistoma ao conjunto de todos os genes de resistência a drogas presentes em um dado metagenoma, o que ainda é pouco estudado em queijos, especialmente na variedade Minas Frescal. No entanto, dados da literatura já demonstram isolamento de amostras bacterianas relacionadas a grupos microbianos específicos neste tipo de queijo, sejam artesanais ou industrializados, e a detecção nestes microrganismos, de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas.

Os avanços na área da biologia molecular têm proporcionado o desenvolvimento de técnicas promissoras para o estudo de comunidades microbianas e para o conhecimento do resistoma. Os métodos tradicionais de análise envolvem a caracterização de culturas isoladas em laboratório e apresentam algumas limitações. A principal delas deve-se ao fato de que grande parte dos microrganismos de comunidades microbianas não são cultiváveis. Sendo assim, técnicas baseadas na análise de regiões específicas do genoma bacteriano constituem alternativas para o estudo das características, estrutura e diversidade de comunidades bacterianas, sem a necessidade de isolamento.

Considerando-se a carência de estudos voltados para a caracterização do perfil de comunidades bacterianas em queijo Minas Frescal e do seu resistoma, utilizando metodologias independente de cultivo, pretende-se contribuir com conhecimento científico sobre: (i) a estrutura da comunidade microbiana em queijo Minas Frescal industrializados; (ii) a ocorrência de marcadores genéticos bacterianos relacionados à resistência a drogas de interesse médico (resistoma clínico); (iii) o potencial de

mobilização dos marcadores genéticos bacterianos relacionados à resistência, pela pesquisa de integrons das classes de 1, 2 e 3.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Queijo Minas Frescal

O queijo é um produto lácteo que há muitos anos tem desempenhado um papel importante na alimentação humana, sendo um dos alimentos mais antigos registrados pela história da humanidade. É um dos principais derivados do processamento do leite, apresentando grande diversidade de aromas, texturas e formas (FOX e MCSWEENEY, 2004; CHANDRAPALA e ZISU, 2016; SILVA et al., 2017). Pode ser definido como um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas ou de outro fator coagulante, todos de qualidade apta para uso alimentar (BRASIL, 1996).

O mercado brasileiro de queijos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, impulsionado pelo aumento do poder aquisitivo e por suas características nutricionais e sensoriais. A sua produção apresenta grande importância econômica, sendo o Brasil o sexto maior produtor mundial. O consumo nacional médio de queijos por habitante no Brasil é de aproximadamente 5,1 quilos por ano. Este valor vem crescendo, mas ainda é pequeno quando comparado com outros países, como a Argentina e Uruguai, onde o consumo é de 11 quilos por habitante. O estado de Minas Gerais é reconhecidamente o estado mais tradicional na produção de queijos no Brasil, e responde pela metade do consumo no país (ABIQ, 2014; LEITE & DERIVADOS, 2015).

O queijo tipo Minas Frescal é considerado um dos mais populares, tem uma ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar de grande parte da população em todas as regiões do país. Sua fabricação no Brasil foi iniciada em Minas Gerais, nas regiões onde o gado leiteiro era dominante no século XVIII (GOMES; FRANCO e DE MARTINIS, 2013; FELICIO et al., 2016). A produção do queijo Minas Frescal aumentou de 42.700 toneladas em 2000 para 63.555 toneladas em 2011. Atualmente, ocupa a quinta posição dentre os queijos mais produzidos, atrás apenas dos queijos tipo mussarela, prato e requeijão culinário e cremoso (NUNES et al., 2016). Sua produção apresenta grande importância econômica para as indústrias de grande e pequeno porte pois o processamento é relativamente simples, possui alto



rendimento e ausência de maturação, proporcionando rápido retorno dos investimentos aos produtores (VAN DENDER e SCHNEIDER, 2007; APOLINÁRIO, 2014).

Segundo a Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997), através da Resolução MERCOSUL nº 145/96 (BRASIL, 1996), o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas na forma de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. É classificado como um queijo semi-gordo, de 25 a 44,90% de gordura, de muito alta umidade (maior que 55%), consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, sabor suave a levemente ácido, forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5 Kg (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997; BRASIL, 2004).

No Brasil, o queijo Minas pode ser produzido de forma artesanal ou em grande escala (DIAS et al., 2016). O queijo Minas produzido em setor informal, é comercializado em feiras livres ou de forma autônoma e produzido a partir do leite *in natura*, desde que sejam respeitados os prazos de maturação e utilizadas as boas práticas de fabricação (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; CARDOSO e ARAÚJO, 2004). A Lei Estadual Nº 20549 de 18/12/2012 dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, visando a valorização dos produtores e criação de regras para a expansão do agronegócio familiar (MINAS GERAIS, 2012). Já o queijo Minas Frescal industrializado, deve atender aos requisitos de qualidade e identidade preconizados pela Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sua produção deve ser feita a partir de leite pasteurizado, em indústria laticinista, com serviço de inspeção (BRASIL, 1996).

Na produção de queijo Minas Frescal industrializado, diversas alternativas tecnológicas têm sido utilizadas pelos laticínios, como por exemplo: a adição de ácido láctico industrial, o emprego tradicional de fermento láctico, substituição parcial do fermento por ácido láctico, ultrafiltração, variações na temperatura de coagulação ou até mesmo emprego de prensagem. Essa grande diversidade de processamentos varia conforme a região, estado ou, mais especificamente, conforme a indústria de laticínio. Apesar de envolver etapas de produção semelhantes, essa diversificação da metodologia para a sua elaboração é apontada como um dos principais fatores responsáveis por diferenças encontradas nos parâmetros físico-químicos e

microbiológicos de amostras de queijo Minas Frescal (BRIGIDO et al., 2004; FOX e COGAN, 2004; FRITZEN-FREIRE et al., 2010). Por isso, é bastante comum observar variações entre queijos Minas de origens, lotes de produção ou formas de processamento diferentes. No entanto, os consumidores esperam que os queijos de uma mesma variedade apresentem certa identidade e reprodutibilidade, principalmente para os queijos produzidos em larga escala, como o Minas Frescal (RIBEIRO; SIMÕES e JURKIEWICZ, 2009; SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011; PERIN et al., 2017).

Sabe-se que a atividade dos microrganismos produz transformações importantes na matriz dos queijos, afetando diretamente a sua qualidade e as propriedades do produto final, como sabor, textura, aspecto visual e características nutricionais. As características microbiológicas por sua vez, são influenciadas não apenas pela forma de processamento, mas também pela matéria prima utilizada para a fabricação do queijo, práticas de higiene durante fabricação, condições de armazenamento e tempo de maturação (BEMFEITO et al., 2016; SILVA et al., 2017). Diante desse contexto, a avaliação e a caracterização do perfil microbiano do queijo Minas Frescal pode representar uma ferramenta importante para o estudo da sua identidade e padronização, assim como para o seu controle de qualidade (PEREIRA, GOMES e XAVIER MALCATA, 2009; DIAS et al., 2016).

### **2.1.1 Cadeia produtiva do Queijo Minas Frescal e implicações no perfil da sua microbiota**

A produção do Queijo Minas Frescal fabricado em indústrias de laticínio prevê a realização de diversas etapas tecnológicas (Figura 1). Algumas diversificações da metodologia para sua fabricação podem ser observadas nas linhas de produção de diferentes indústrias, trazendo implicações diretas na uniformidade do produto, tanto em aspectos físico-químicos como microbiológicos (FURTADO et al., 1980).

A qualidade do queijo Minas Frescal é determinada primeiramente pela qualidade da matéria prima utilizada para sua fabricação (PINTO et al., 2011; MURPHY et al., 2016; SILVA et al., 2017). A microbiota inicial do leite *in natura* terá uma influência direta na qualidade do leite pasteurizado e conseqüentemente, no queijo produzido a partir dele. O leite é um excelente meio para o crescimento de vários grupos de microrganismos contaminantes, uma vez que apresenta uma grande

variedade de nutrientes disponíveis. Por isso, pode ser considerado fator crítico de comprometimento de toda a linha de produção de queijos, caso os cuidados com as boas práticas de fabricação sejam negligenciados (SHARAF et al., 2014; YADAV et al., 2014; SAHU e BALA, 2017). Esses cuidados envolvem a saúde do rebanho, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados, armazenamento adequado em tanques de expansão até o transporte para o laticínio, além de tratamento térmico adequado (SOUZA; NOGUEIRA e NUNES, 2011; MENEZES et al., 2014).

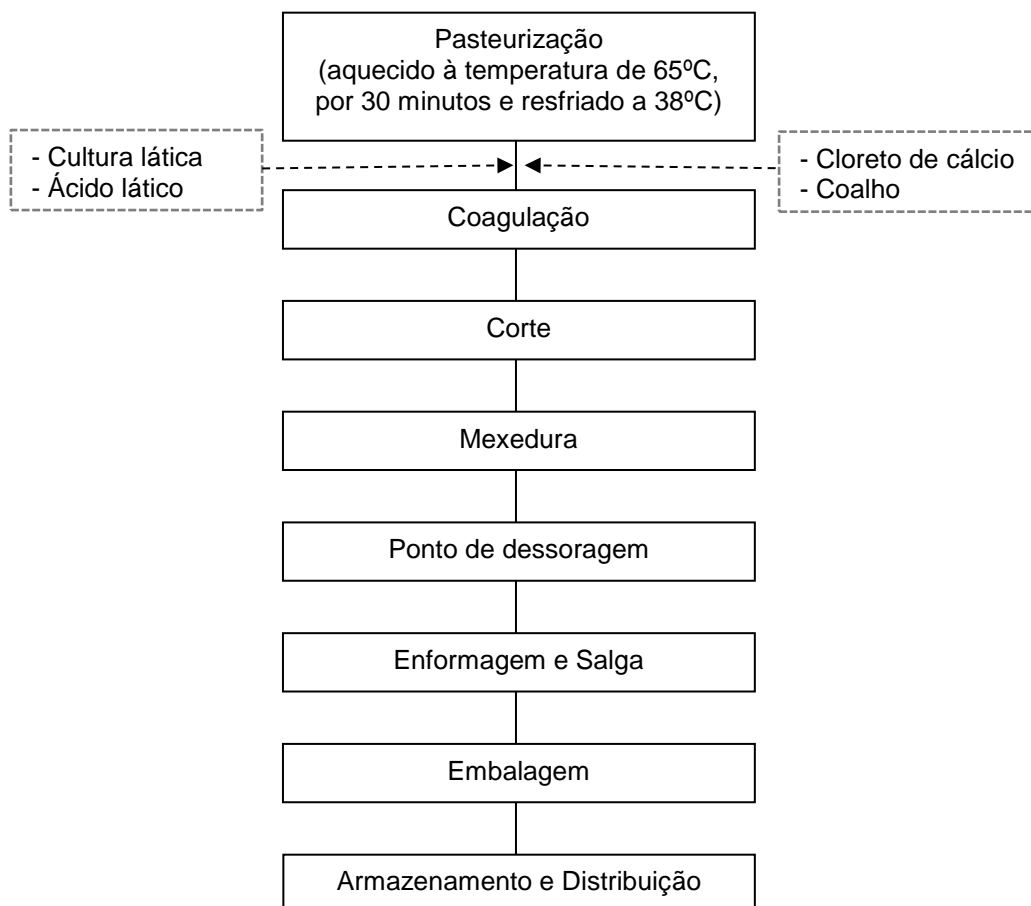


Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal  
Fonte: Adaptado de PIAZZON-GOMES, PRUDÊNCIO e SILVA, 2010

O queijo Minas Frescal industrializado é fabricado em indústrias de laticínios a partir de leite pasteurizado, acompanhado por serviço de inspeção (BRASIL, 1996). A pasteurização tem como objetivo a inativação dos microrganismos patogênicos, que

em determinadas circunstâncias podem estar presentes no leite. A redução da carga microbiana constitui a base para os posteriores processos de transformação do leite na elaboração de queijos (MENEZES et al., 2014; SARKAR, 2015; MURPHY et al., 2016). A Instrução Normativa 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece os regulamentos de produção, identidade e qualidade tanto para o leite *in natura* refrigerado produzido nas propriedades rurais e destinado à obtenção de leite pasteurizado, como também para o leite pasteurizado (BRASIL, 2002).

Durante o processo de pasteurização do leite, além da redução de microrganismos contaminantes prejudiciais à saúde, ocorre também redução de grande parte da microbiota endógena, eliminando parte das bactérias do ácido láctico (BAL) e facilitando a fabricação do queijo com maior uniformidade (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009). As BAL incluem um amplo grupo de bactérias com características morfológicas de cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativo, não formadoras de esporos e não móveis (CARR, CHILL e MAIDA, 2002). Incluem uma grande quantidade de gêneros bacterianos entre os quais os mais conhecidos são *Lactobacilos*, *Lactococos*, *Enterococos*, *Streptococos*, *Leuconostoc* e *Pediococos* (PESSIONE, 2012).

Esse grupo bacteriano desempenha um papel importante na elaboração de queijos. A liberação de ácido láctico como subproduto do seu metabolismo resulta numa diminuição gradativa do pH, o que melhora a atividade de coagulação e torna o queijo menos propício ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (KONGO, 2013; CHANDRAPALA e ZISU, 2016). Além disso, algumas bactérias lácticas também causam transformações bioquímicas de lipídios e proteínas, que aumentam o índice de proteólise e lipólise no queijo e contribuem para o desenvolvimento de aroma e sabor durante o armazenamento (LEROY e DE VUYST, 2004; LUIZ et al., 2016).

No processamento tradicional do Queijo Minas Frescal produzido industrialmente, a coagulação enzimática do leite pasteurizado pode ser complementada pela adição de fermento láctico, geralmente composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (EMBRAPA, 2005; NUNES et al., 2016). O fermento láctico tem a função de melhorar a atividade coagulante, auxiliar na expulsão do soro da coalhada e promover a prevenção da multiplicação de bactérias indesejáveis (FOX et al., 2000). No entanto, a ação continuada de bactérias lácticas do fermento no queijo Minas Frescal pode provocar aumento excessivo de acidez e

alterações no aspecto, textura e sabor do queijo (FURTADO, SOUZA e MUNCK,1980).

Um método alternativo é a fabricação do Queijo Minas Frescal por acidificação direta do leite com ácido láctico antes da adição do coalho, sem a adição de fermento. Neste processo, o queijo não apresenta a ação da cultura láctica durante a sua vida de prateleira, e a redução do pH, no tanque de fabricação, favorece a segurança do produto. Essa alteração na tecnologia de fabricação resulta em um queijo com maior umidade, menor acidez e maior rendimento, quando comparado a um queijo fabricado com adição de fermento (FURTADO, SOUZA e MUNCK,1980). Os queijos Minas podem ainda ser fabricados apenas pela adição do agente coagulante, sem adição do fermento ou ácido láctico. Nesse caso, apesar de também apresentar um rendimento maior quando comparado à fabricação pelo método tradicional, o queijo possui um pH mais elevado desde o início do processo e se torna mais propenso a proliferação de microrganismos indesejáveis. Essas variações no processo de fabricação podem afetar diretamente a composição de bactérias lácticas na microbiota do queijo (BRASIL, 1997; RALL et al., 2010; FRITZEN-FREIRE et al., 2010).

Após a pasteurização, o leite passa por procedimentos necessários para coagulação da caseína e dar origem à massa do queijo. A etapa de coagulação normalmente é feita em tanques de aço inoxidável e são adicionados os seguintes componentes: coalho, agente promotor da coagulação; cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para repor teor de cálcio no leite, reduzir o tempo de coagulação e conferir elasticidade a massa do queijo; fermento láctico ou ácido láctico, que são adicionados opcionalmente para promover a acidificação. Posteriormente, através de instrumentos denominados liras, é feito o corte da massa obtida pela coagulação em cubos ou grãos, para promover a dessoragem. Para auxiliar esta etapa, é feita a agitação. Ao atingir o ponto final, a massa é colocada em formas onde a dessoragem é complementada. A salga é realizada sobre o queijo enformado ou pela mistura do sal na massa antes de enformar. Ao final do processo, os queijos são embalados em embalagens plásticas e armazenados sob refrigeração (PEREIRA et al., 2006; EMBRAPA, 2005).

A fabricação do queijo Minas Frescal, de modo geral, requer a utilização de equipamentos como tanques de coagulação, mesa de enformagem, pás, espátulas e similares. Além disso, sua fabricação prevê etapas tecnológicas que requerem a manipulação do produto por parte dos trabalhadores, sem que haja posteriormente, tratamentos eficientes para reduzir a carga microbiana. Dessa forma, o

processamento após o processo de pasteurização pode constituir um fator de risco para contaminações microbiológicas, caso não sejam adotadas medidas rigorosas de boas práticas de fabricação (MEDVEĎOVÁ et al., 2013).

As próprias características do queijo Minas Frescal – pH acima de 5,0, baixo conteúdo de sal (1,4 – 1,6 %), ausência de conservantes e elevada umidade – favorecem alterações bioquímicas e microbiológicas que afetam a sua qualidade e durabilidade (FURTADO et al., 2015; NUNES et al., 2016). Embora seja um queijo fresco e de consumo direto, o queijo Minas Frescal sofre alterações durante o período de estocagem, sendo caracterizado por ser perecível e com vida de prateleira curta, geralmente com validade de 15 a 20 dias. Por isso, temperaturas adequadas de refrigeração e condições corretas de armazenamento também estão diretamente relacionadas a qualidade do produto final (GOMES; FRANCO e DE MARTINIS, 2013).

Os produtos lácteos, principalmente queijos frescos, por possuírem condições propícias à proliferação de microrganismos, são considerados meios comuns de transmissão de patógenos (DAMACENO et al., 2015). As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por patógenos ou toxinas, devido a falhas de higienização, manipulação, conservação e distribuição. Além de representar perigo para a saúde do consumidor, a contaminação microbiana na indústria de alimentos acarreta grandes prejuízos econômicos. Por isso, o interesse na segurança alimentar tem sido crescente (BRASIL, 2010; SILVA JÚNIOR, 2014).

Os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e também apontam riscos de contaminações, provável presença de patógenos e indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias no processamento, na produção e no armazenamento. Dentre os principais microrganismos indicadores em queijos destacam-se: coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* spp., bolores e leveduras, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (FREITAS et al., 2013; AMORIM et al., 2014).

De acordo com a RESOLUÇÃO ANVISA - RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001 (BRASIL, 2001), os queijos classificados como de muito alta umidade (> 55%), como o Minas Frescal, devem respeitar os seguintes critérios e padrões microbiológicos: 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 por grama (UFC/g) de *Staphylococcus coagulase* positivo.

Apesar da exigência quanto aos parâmetros microbiológicos, muitos estudos realizados com queijo tipo Minas Frescal têm permitido o isolamento e identificação desses microrganismos, que na maioria das vezes estão presentes acima dos valores preconizados (FREITAS et al., 2013; APOLINÁRIO, 2014; NUNES et al., 2016). Dias e colaboradores (2016), observaram que 70% das amostras de Queijo Minas avaliadas apresentaram contagem acima do limite máximo permitido para coliformes termotolerantes, 100% e 70% das amostras estavam em desacordo com os padrões estabelecidos para coliformes totais e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Essas observações sugerem a utilização de matéria prima de má qualidade e/ou falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do produto.

Considerando os valores econômicos e culturais do queijo Minas Frescal, embora a legislação sanitária atual considere a presença de grupos microbianos específicos como indicadores de segurança e qualidade, outras que também são potencialmente patogênicas são negligenciadas, especialmente considerando o surgimento dos fenômenos de resistência antimicrobiana (FONTES et al., 2013; RESENDE et al., 2018). Essas bactérias que geralmente são consideradas inofensivas na cadeia alimentar estão se tornando preocupantes com o crescimento do fenômeno da resistência antimicrobiana. Resende et al. (2018) recentemente relataram a ocorrência de patógenos oportunistas em queijo Minas frescal industrializado, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, que apresentavam genes de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos. Apesar desse e de outros relatos, o papel do Queijo Minas Frescal na dinâmica da disseminação da resistência ainda precisa ser melhor caracterizado.

## **2.2 Fenômeno da resistência aos antimicrobianos**

### **2.2.1 Aspectos gerais da antibioticoterapia**

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, abriu uma nova era no tratamento de doenças infecciosas, descrita como a "idade de ouro" da pesquisa com antibióticos. A descoberta de outros antimicrobianos através de triagens de produtos naturais microbianos logo se seguiu, e incluiu antibióticos amplamente utilizados, como estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina (GUIMARÃES;

MOMESSO e PUPO, 2010). Pela primeira vez, muitas doenças bacterianas comuns podiam ser curadas e por isso, os antibióticos foram considerados "drogas milagrosas". Como resultado desse sucesso inicial, as doenças bacterianas foram ingenuamente consideradas como permanentemente eliminadas (PENESYAN; GILLINGS e PAULSEN, 2015; LEKSHMI et al., 2017).

No entanto, com o aumento do uso indiscriminado de antibióticos, o aparecimento de bactérias resistentes aos seus efeitos inibitórios tornou-se cada vez mais frequente. Conseqüentemente, apesar da sua eficácia inicial, a maioria dos antibióticos passou a ter uma vida limitada e, a partir da sua primeira introdução, foram selecionadas variantes patogênicas, que possuíam mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos (VERRAES et al., 2013). A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana é a capacidade de resistir à ação de um antibiótico como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes. A resistência antimicrobiana adquirida pode ser resultado da aquisição de um gene de resistência por transferência horizontal e de mutações espontâneas, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos microrganismos mais aptos. As drogas antimicrobianas, nesse contexto, atuam como agentes de pressão seletiva (MOTA et al., 2005; BLAIR, WEBBER, e BAYLAY, 2015; MARTINEZ, COQUE e BAQUERO, 2015).

Atualmente, a resistência antimicrobiana ameaça a prevenção e o tratamento efetivo de uma gama cada vez maior de infecções. Novos mecanismos de resistência emergem e rapidamente se espalham globalmente, representando um problema de saúde pública. A situação requer ação imediata, caso contrário, as taxas de mortalidade por doenças infecciosas poderão em breve se assemelhar àquelas como antes da descoberta dos antibióticos (FIELDS, LEE e MCCONNELL, 2017; SPENGLER et al., 2017). Relatos descrevem a identificação e disseminação de genes de resistência a antibióticos de último recurso, como a colistina (LIU et al., 2016; MCGANN et al., 2016). No Brasil, a ocorrência de plasmídeo carregando o gene *mcr-1*, que codifica resistência a colistina, foi reportado pela primeira vez por Fernandes et al. (2016), em *Escherichia coli* recuperada de um paciente com infecção.

O aumento do fenômeno de resistência pode ser associado a diversos fatores, incluindo o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, transferência de genes entre células bacterianas, más condições de higiene pública e fluxo contínuo de viajantes pelo mundo. A demora no diagnóstico das infecções bacterianas, em



muitos casos, leva os médicos a lançarem mão precocemente dos antibióticos de amplo espectro, o que também contribui para a seleção de bactérias resistentes (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Os aspectos econômicos também são preocupantes. As indústrias farmacêuticas desejam receber o retorno financeiro investido ao longo do processo de desenvolvimento após terem um antibiótico lançado no mercado. Entretanto, o investimento na busca de agentes antibióticos fica mais complicado, pois o surgimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (MOTA et al., 2005).

Diante desse cenário, o uso racional de antibióticos, o controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, são estratégias que devem ser adotadas. Além disso, a caracterização dos genes de resistência, assim como a compreensão dos fatores que conduzem a disseminação desses genes, são importantes para o entendimento do fenômeno da resistência (PENESYAN, GILLINGS e PAULSEN, 2015).

### **2.2.2 Resistoma**

No passado, o foco histórico da pesquisa em resistência aos antibióticos estava voltado para o estudo de alguns genes que conferem resistência em patógenos clínicos. No entanto, em muitos casos, estes estudos fornecem pouca informação sobre as origens e fontes da resistência a antibióticos. O que foi em grande parte ignorado durante muitos anos, é o grande reservatório de genes de resistência que existe tanto no ambiente como na clínica. O desenvolvimento de técnicas microbiológicas independentes de cultivo possibilitou novas abordagens para o conhecimento desses determinantes genéticos associados à resistência (PERRY, WESTMAN e WRIGHT, 2014; DOYLE, 2015).

Um dos eventos mais notáveis no campo da ecologia microbiana na última década foi o desenvolvimento da metagenômica. A metagenômica é definida como a análise de todo o material genético presente em uma determinada amostra ambiental, constituída pelos genomas de muitos organismos individuais. Esse material genético total por sua vez, é chamado de metagenoma (THOMAS, GILBERT e MEYER, 2012). A porção do metagenoma que contém os genes de resistência destes microrganismos

pode ser acessada para a caracterização do resistoma de determinada amostra (WILLMANN e PETER, 2017).

A inevitabilidade da resistência levou ao surgimento do conceito de resistoma, que consiste na totalidade de genes de resistência presentes em bactérias clinicamente significativas, bactérias comensais de seres humanos e animais e bactérias ambientais. Os genes de resistência a antibióticos de importância clínica podem ser definidos como resistoma clínico (WRIGHT, 2010; WALSH, 2013; PERRY, WESTMAN e WRIGHT, 2014). O resistoma também envolve a resistência intrínseca e a resistência adquirida, além dos genes denominados proto-resistência, que apesar de não conferirem resistência fenotípica na sua forma genética original, possuem o potencial para se tornarem genes de resistência através de mutações ou alterações na sua expressão (GILLINGS, 2013; MARTINEZ; COQUE e BAQUERO, 2015). O estudo do resistoma é fundamental para a compreensão do papel dos diferentes ecossistemas como reservatórios de genes de resistência. Além disso, permite o melhor entendimento sobre origem, causas e fatores ambientais envolvidos na propagação do fenômeno, bem como prevê a emergência de novas formas de resistência (WRIGHT, 2010; GILLINGS, 2013).

Os genes de resistência aos antimicrobianos podem codificar resistência por diferentes mecanismos. A resistência a uma classe antimicrobiana geralmente pode ser conseguida através de múltiplos caminhos bioquímicos (BLAIR et al., 2015). Por outro lado, as espécies bacterianas parecem ter desenvolvido uma preferência por alguns mecanismos de resistência em relação a outros. Por exemplo, o mecanismo predominante de resistência a  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas é a produção de  $\beta$ -lactamases, enquanto que a resistência a estes compostos em organismos Gram-positivos é principalmente obtida por modificações do seu local alvo, as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (MUNITA e ARIAS, 2016).

Uma das estratégias de resistência bacteriana mais bem-sucedida é a produção de enzimas que inativam a droga, através da adição de porções químicas específicas ao composto ou destruição da própria molécula (GIEDRAITIENĖ et al., 2011). Um dos melhores exemplos de resistência através da modificação do fármaco é a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, que modificam os grupos hidroxila ou amino da molécula de aminoglicosídeo. O gene *aacA-aphD* codifica uma enzima bifuncional com atividades de acetilação e fosfotransferase, encontrada principalmente em organismos Gram-positivos (MUNITA e ARIAS, 2016).

A destruição de moléculas antimicrobianas é o principal mecanismo de resistência bacteriana à  $\beta$ -lactâmicos, realizada pela ação das  $\beta$ -lactamases. Essas enzimas destroem a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, tornando o antimicrobiano ineficaz. Os genes que codificam  $\beta$ -lactamases são geralmente denominados *bla* e podem ser encontrados no cromossomo ou localizados em elementos genéticos móveis e integrons. Mais de 1.000 variantes de  $\beta$ -lactamases já foram descritas e podem ser codificadas por diversos genes como *bla<sub>Z</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*. (SHAIKH et al., 2015; TEKINER e OZPINAR, 2016). Dois principais esquemas de classificação foram propostos em uma tentativa de agrupar esta grande quantidade de enzimas. O primeiro baseia-se na identidade da sequência de aminoácidos (classificação de Ambler) e o segundo, na sua função bioquímica, principalmente com base na especificidade do substrato (classificação Bush-Jacoby) (DRAWZ e BONOMO, 2010).

A produção de estruturas denominadas bombas de efluxo tem um importante papel fisiológico, atuando ativamente no transporte de compostos tóxicos para fora da célula bacteriana como metais pesados, corantes, detergentes, solventes orgânicos (BLANCO et al., 2016). Do ponto de vista da resistência aos antibióticos, as bombas que transportam vários compostos podem ser associadas a resistência significativa a diferentes antimicrobianos (resistência cruzada), com grande capacidade para expelir antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e, em alguns casos, aminoglicosídeos (KUMAR e SCHWEIZER, 2005; PIDDOCK, 2006). Esses antimicrobianos agindo como substratos, podem aumentar a expressão dos genes que codificam essas bombas, acarretando perfil de multirresistência.

Os genes que codificam bombas de efluxo podem ser localizados em elementos genéticos móveis ou no cromossomo, considerando que as bombas codificadas cromossomicamente podem explicar a resistência intrínseca de algumas espécies bacterianas a um antibiótico específico (SUN, DENG e YAN, 2014). A resistência à tetraciclina é um dos exemplos clássicos de resistência mediada por bombas de efluxo, codificadas por genes *tet*, os quais são preferencialmente encontrados em Gram-negativos, sendo *tet(K)* e *tet(L)* exceções que predominam em Gram-positivos (MUNITA e ARIAS, 2016).

Outras estratégias comuns de resistência bacteriana estão associadas a interferências no sítio alvo de ligação do antibiótico. Para isso, as bactérias desenvolveram táticas diferentes, incluindo a proteção do alvo (evitando que o

antibiótico alcance seu local de ligação) e modificações do sítio alvo, que resultam em afinidade diminuída para a molécula antibiótica (BLAIR et al., 2015). A maioria dos genes clinicamente relevantes envolvidos com mecanismos de proteção do alvo do antibiótico são transportados por elementos genéticos móveis. Alguns exemplos de genes associados a este mecanismo incluem *tet(M)* e *tet(O)*, que codificam proteínas que interagem com o ribossomo e desalojam tetraciclinas do seu local de ligação e o gene *qnr*, um determinante de resistência a fluoroquinolonas, que codifica proteína homóloga a molécula de DNA, competindo com o local de ligação da DNA girase e topoisomerase IV (MUNITA e ARIAS, 2016).

Um dos melhores exemplos caracterizados de resistência através da modificação enzimática do sítio alvo é a metilação do RNA ribossômico catalisada por uma enzima codificada pelos genes *erm*, o que resulta em resistência aos macrolídeos (BLAIR et al., 2015). Algumas bactérias também são capazes de desenvolver novos alvos que realizam funções bioquímicas similares do alvo original, mas que não são inibidas pela molécula antimicrobiana. Um dos exemplos clínicos mais relevantes incluem a resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* determinada pela presença do gene *mecA*. Esse gene codifica uma proteína ligadora de penicilina modificada (PBP2a) com baixa afinidade para todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenênicos (SOARES et al., 2012; MUNITA e ARIAS, 2016).

Alguns elementos genéticos bacterianos são capazes de se mover livremente entre espécies bacterianas em um processo conhecido como transferência horizontal de genes. Esses elementos e os genes que eles carregam são coletivamente conhecidos como mobiloma, e incluem plasmídeos, transposons, integrons, sequências de inserção e elementos conjugativos integrativos. Muitos genes de resistência aos antibióticos são encontrados nesses elementos genéticos móveis, permitindo que o resistoma seja amplamente disseminado pela transferência horizontal de genes (GILLINGS, 2013; PERRY e WRIGHT, 2013).

### 2.2.3 Integrons

Os integrons representam uma classe importante de elementos genéticos, capazes de integrar genes de resistência a diversos antimicrobianos, expressá-los e

disseminá-los entre as bactérias (CAMBRAY, GUEROUT e MAZEL, 2010). Os integrons tem sido encontrados em mais de 15% de genomas bacterianos, onde geralmente se encontram em cromossomos. A história evolutiva dos integrons sugere que integrons cromossomais (IC) encontraram caminho para bactérias clinicamente relevantes através da sua associação com transposons e plasmídeos conjugativos. Isso permitiu a dispersão eficiente de integrons inter e intra-espécies, e assim, sua classificação como integrons móveis (IMs) (RAVI et al., 2014; ESCUDERO, 2015; GILLINGS, 2017).

A estrutura funcional de um integron (Figura 2) consiste em um gene (*intI*) codificador de uma recombinase sítio-específica, denominada integrase, seguido de um sítio de recombinação *attI*. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e um segundo sítio chamado *attC*. O sítio *attC* é normalmente associado a uma ORF (*open reading frame*) de fita simples circular, formando uma estrutura chamada cassete gênico. Genes que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos são encontrados nos integrons na forma de cassetes gênicos. A maioria dos integrons sequenciados e caracterizados contém pelo menos um gene de resistência adquirido (DAVIES e DAVIES, 2010; GILLINGS, 2014; RAVI et al., 2014; DENG et al., 2015).

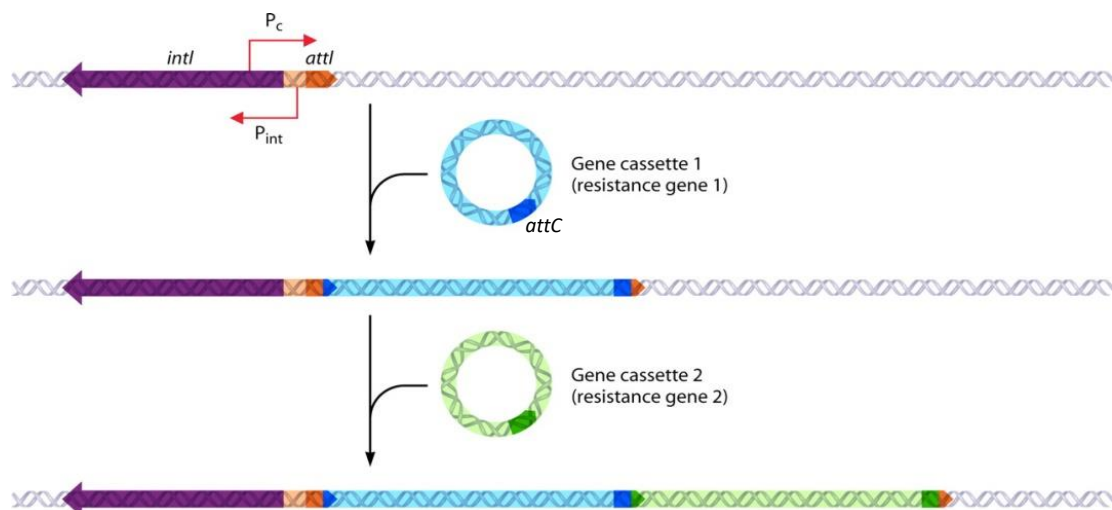


Figura 2. Estrutura do Integron e mecanismo de captura de genes  
Fonte: Adaptado de Davies, 2010

Esses cassetes gênicos são elementos móveis sem promotores que podem ser incorporados e excisados dos integrons. Uma vez que não possuem um promotor e portanto, capacidade de se expressar de forma independente, a transcrição dos

cassetes gênicos ocorre quando estão inseridos no integron. Sua transcrição é dirigida por um promotor forte associado ao integron (*Pc*) orientado para o ponto de integração (MICHAEL et al., 2004; MAZEL, 2006; PINTO, 2013). O promotor da integrase (*Pint*) também é um componente chave dos integrons. A regulação e a expressão da integrase estão sob o controle de respostas adaptativas bacterianas a situações de estresse fisiológico, incluindo respostas adaptativas induzidas pela presença de antibióticos. Portanto, esse recurso confere ao sistema integron a capacidade de se adaptar às mudanças ambientais, condicionando assim a recombinação induzida por situações de estresse (CAMBRAY, GUEROUT e MAZEL, 2010; CAMBRAY et al., 2011).

Atualmente, cinco classes diferentes de integrons móveis são bem caracterizadas, classificadas com base na sequência do gene codificador da integrase (*intI*). Apesar das cinco classes estarem associadas com determinantes de resistência a antibióticos, apenas as classes 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) e 3 (*intI3*) tem sido historicamente envolvidas na propagação de fenótipos de multirresistência e são consideradas as mais importantes do ponto de vista clínico (MAZEL, 2006; GILLINGS, 2014; RAVI et al., 2014; ESCUDERO, 2015).

#### **2.2.4 Alimentos como potenciais reservatórios de genes de resistência**

O fenômeno da resistência aos antimicrobianos é considerado um problema que envolve não apenas os ambientes hospitalares, mas também ambientes naturais e comunitários como potenciais reservatórios de genes de resistência (WALSH, 2013). Nesse contexto, a cadeia de produção e consumo dos alimentos desempenha um papel importante. A ingestão de alimentos, especialmente contendo bactérias resistentes patogênicas, muitas vezes resulta em aumento no número de hospitalizações e aumento do risco de infecção invasiva e mortalidade (VERRAES et al., 2013). Portanto, a segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para os órgãos responsáveis pela saúde pública (DOYLE, 2015).

Ao longo dos anos, os antibióticos têm sido amplamente utilizados na pecuária com diversas finalidades: tratamento de infecções (uso terapêutico), prevenção de surtos de doenças em animais (profilaxia) e promoção do crescimento (MATHEW,

CISSELL e LIAMTHONG, 2007; LANDERS et al., 2012; FRAQUEZA, 2015). Assim como na medicina humana, o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, principalmente para promoção do crescimento, também pode promover a seleção de bactérias resistentes, e conseqüentemente, sua ocorrência em alimentos de origem animal, como carnes, leites e derivados (PERRY e WRIGHT, 2013; LEKSHMI et al., 2017).

A disseminação de bactérias resistentes através da cadeia alimentar também envolve os manipuladores. Diversos estudos têm relatado o isolamento e a identificação de bactérias resistentes a vários antimicrobianos, presentes principalmente nas mãos de pessoas envolvidas na manipulação de alimentos em diferentes locais, como restaurantes, feiras e cozinhas de hospitais (TAN, LEE e MAHYUDIN, 2014; DA SILVA et al., 2015; CASTRO et al., 2016; MACEDO et al., 2016). Campos e colaboradores (2006) realizaram a caracterização fenotípica pelo antibiograma de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores de queijo Minas Frescal em um laticínio. Foi possível identificar isolados do nariz e das mãos que apresentaram resistência a diferentes classes de antibióticos. Dessa forma, torna-se importante alertar e educar os trabalhadores que atuam na produção, transformação, fabricação, preparação e comércio de gêneros alimentícios (KIRBIS e KRIZMAN, 2015; CASTRO et al., 2016).

A situação torna-se mais preocupante à medida que esses alimentos podem tornar-se reservatório de genes de resistência a drogas potencialmente mobilizáveis, podendo ser transferidos para a microbiota intestinal humana (LANDERS et al., 2012; PERRY, WESTMAN e WRIGHT, 2014). Os três principais mecanismos de transferência horizontal de genes entre as bactérias são a conjugação, transformação e transdução. Esses mecanismos podem ocorrer entre as bactérias presentes no solo, na água e no sistema digestório de seres humanos e animais. A conjugação é o principal mecanismo de transferência horizontal no intestino e permite a transferência de elementos genéticos como plasmídeos, transposons e integrons, que por sua vez, podem carregar genes de resistência (VERRAES et al., 2013; CHAMOSA et al., 2017).

Devido à riqueza de nutrientes, ao processo de produção e a acessibilidade, os produtos lácteos podem ser considerados veículos de disseminação de microrganismos e seus marcadores de resistência a drogas (DAMACENO et al., 2015; FRAQUEZA, 2015). Diversos estudos têm avaliado a ocorrência de alguns genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos em bactérias isoladas de alimentos

lácteos (Tabela 1). Particularmente, um trabalho realizado por Resende et al. (2018) relatou a ocorrência de genes de resistência a diferentes classes de antibióticos, detectados em isolados de amostras de Queijo Minas Frescal industrializados, produzidos em diferentes laticínios.

No entanto, o conhecimento sobre o resistoma dos queijos, especialmente os queijos do tipo Minas Frescal, ainda é pequeno. A maioria dos estudos investiga o perfil de resistência de microrganismos específicos isolados de queijos e produtos lácteos, através de testes de susceptibilidade a antimicrobianos ou através da detecção de genes de resistência específicos (Tabela 1). A utilização de técnicas independentes de cultivo possibilita o conhecimento sobre o conjunto de genes de resistência presentes no DNA total de comunidades microbianas, bem como permite a avaliação da presença de elementos genéticos envolvidos na disseminação desses genes, como os integrons. Esse tipo de abordagem poderia contribuir para o melhor entendimento de como o Queijo Minas Frescal está inserido na dinâmica de disseminação da resistência, bem como levantar questões relacionadas a contaminação na cadeia produtiva.

Tabela 1 – Genes de resistência encontrados em isolados bacterianos de produtos lácteos

Alimento	Isolado	Genes de Resistência	Referência
Leite fermentado	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>	HUMMEL; HOLZAPFEL e FRANZ, 2007
Leite <i>in natura</i> e queijo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>erm A</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>mec A</i> , <i>blaZ</i> , <i>aacA-aphD</i> , <i>mecA</i>	JAMALI et al, 2015
Leite	<i>Lactobacillus</i>	<i>ermB</i> , <i>tet(W)</i> , <i>gyrA</i> , <i>vanX</i>	GUO et al., 2017
Queijo	<i>Echerichia coli</i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>tet(B)</i> , <i>tet(A)</i> <i>blaCMY-2</i>	RIBEIRO et al., 2016
Queijo	<i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>mrsA</i> , <i>mrsB</i> , <i>linA</i> , <i>aacA-aphD</i>	RESENDE et al., 2018
Queijo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>blaZ</i>	SPANU et al., 2010



Queijo	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	AMADOR et al., 2009
Queijo, iogurte, leite e nata	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	<i>tet(M)</i> , <i>ermB</i>	GAD; ABDEL-HAMID e FARAG, 2014

---

### 2.3 Abordagens contemporâneas para o estudo da microbiota de queijos

O queijo pode ser considerado um alimento microbiologicamente dinâmico, caracterizado pela presença de uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A composição e as características da microbiota dos queijos são dependentes de vários fatores, como o tipo de tratamento do leite, as práticas de higiene durante a ordenha e fabricação, as condições de armazenamento e o tempo de maturação ( RANDAZZO et al., 2002; PARENTE et al., 2016; PERIN et al., 2017). Além disso, fatores bióticos como plasmídeos, fagos e transposons influenciam as propriedades genéticas e, portanto, também têm grande influência nas características e na diversidade microbiana (FAKRUDDIN e MANNAN, 2013).

A microbiota dos queijos tem sido amplamente estudada por uma grande variedade de técnicas (MAGENIS et al., 2014; ALESSANDRIA et al., 2016; LUIZ et al., 2016; MANGIA, FANCELLO e DEIANA, 2016). Tradicionalmente, o conhecimento das características de uma comunidade microbiana é derivado do estudo de cultivo microbiano, que envolve o isolamento e crescimento de microrganismos antes da sua identificação, de acordo com as características fenotípicas ou genotípicas (COCOLIN; DOLCI e RANTSIOU, 2011; SOHIER et al., 2014).

A principal limitação das técnicas baseadas no cultivo é a existência de grupos microbianos que não são cultiváveis com as técnicas atualmente utilizadas (NDOYE et al., 2011; FUKUDA et al., 2016). O isolamento em meio de cultivo exige que a composição do meio supra todas as necessidades dos microrganismos, porém, o repertório metabólico dos procaríotos é muito vasto. Por esse motivo, a cultura pode não ser representativa da microbiota do queijo e a diversidade microbiana real pode ser subestimada (FAKRUDDIN e MANNAN, 2013; IMHOFF, 2016).

Os avanços na biologia molecular têm proporcionado estratégias promissoras, contornando a necessidade de isolamento e cultivo. Os métodos

independentes de cultivo são reconhecidos como abordagens valiosas para o estudo da biodiversidade, expressão gênica e identificação microbiana em matrizes alimentares, como os queijos (NDOYE et al., 2011). Em geral, estes métodos baseiam-se extração direta do DNA total da amostra. A partir do material genético extraído, diferentes técnicas moleculares podem ser aplicadas de acordo com o que se deseja avaliar (DE FILIPPIS; PARENTE e ERCOLINI, 2016; PERIN et al., 2017).

A maioria das abordagens utilizadas em análises independente de cultivo são baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR). O surgimento dessa técnica levou a novas estratégias para estudar a microbiologia dos alimentos. Nos estágios iniciais, a PCR foi usada principalmente como método de detecção, e no final dos anos 90, o desenvolvimento de várias técnicas associadas à PCR ofereceu a possibilidade de estudar comunidades microbianas em ambientes complexos, como a matriz dos queijos (COCOLIN et al., 2013; IMHOFF, 2016).

A amplificação por PCR de genes conservados, tais como o RNAr 16S, tem sido amplamente utilizada na identificação de microrganismos e no estudo da estrutura e das características de comunidades microbianas (Figura 3). Esse gene possui algumas características fundamentais: estão presentes em todos os procariotos; possuem regiões altamente conservadas, nas quais podem ser desenhados oligonucleotídeos iniciadores universais e regiões variáveis (V1-V9), nas quais a diferenciação é possível. Além disso, o tamanho do gene é relativamente curto (~1.500 pb) e é crescente o número de sequências de DNAr 16S disponíveis para comparação em bases de dados (DE FILIPPIS; PARENTE e ERCOLINI, 2016; FUKUDA et al., 2016).

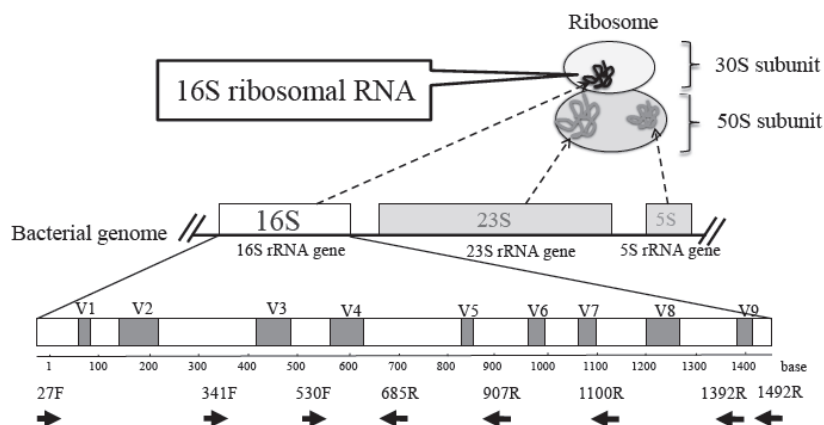


Figura 3: Esquema do gene RNAr 16S

Fonte: NDOYE et al., 2011

Após amplificação por PCR, os produtos da reação refletem uma mistura de “assinaturas” de genes dos microrganismos presentes em uma amostra, incluindo a fração não cultivável (NDOYE et al., 2011). A variabilidade das sequências dos genes pode ser avaliada aliando técnicas de impressões genéticas digitais (*fingerprints*). Essas abordagens são amplamente utilizadas para avaliar diferenças entre os perfis de comunidades microbianas (ZHU et al., 2014; HERAS et al., 2015).

Um número considerável de trabalhos relata o uso da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) como um método de *fingerprint* para estudo da diversidade bacteriana e da dinâmica populacional durante a fabricação de queijos (WALTER et al., 2001; ENDO e OKADA, 2005; ARCURI et al., 2013; FLÓREZ e MAYO, 2015). Coppola e colaboradores (2001) realizaram um dos primeiros estudos de investigação de diversidade microbiana em queijo (Mozzarella) utilizando PCR-DGGE como base para sua pesquisa. Passados quase 20 anos é possível observar uma quantidade crescente de pesquisas relacionadas à determinação do perfil microbiano em queijos. Através dessa técnica, fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com diferentes sequências de pares de bases podem ser separados. A separação é baseada na diferença de migração de moléculas de DNA em géis de acrilamida contendo um gradiente linear de substâncias desnaturantes de DNA (uréia e formamida). A variação da sequência dentro dos fragmentos de DNA provoca uma diferença no comportamento de fusão e, portanto, na separação em géis de gradiente desnaturante (COCOLIN et al., 2013; FAKRUDDIN e MANNAN, 2013; PERIN et al., 2017).

A reação em cadeia da polimerase baseada em sequências repetitivas (rep-PCR) também é uma técnica de *fingerprint* que se baseia na amplificação por PCR de sequências de DNA, localizadas entre sequências repetitivas e altamente conservadas no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e várias Gram-positivas. A amplificação gera um conjunto de fragmentos de DNA de tamanhos variados, que podem ser separados em géis de agarose. Uma das famílias de sequências repetitivas presentes nos genomas de espécies bacterianas é a sequência palindrômica extragênica repetitiva (REP) (MOHAPATRA; BROERSMA e MAZUMDER, 2007; DE VUYST et al., 2008; KESMEN et al., 2012). Essa abordagem geralmente é empregada para o agrupamento de isolados bacterianos, no entanto, em alguns estudos pode ser considerado um método independente de cultura,

utilizando o DNA total extraído diretamente de amostras de queijos para análise de diversidade microbiana (PERIN et al., 2015).

O surgimento das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou os estudos em ecologia microbiana. Esse tipo de tecnologia de ponta levou ao estabelecimento da metagenômica (ERCOLINI, 2013; DE FILIPPIS; PARENTE e ERCOLINI, 2016; PLANÝ et al., 2016). Em comparação com os métodos anteriores independentes de cultura, a análise por esse tipo de abordagem é mais sensível, permitindo a geração do perfil genético de uma amostra ambiental de forma mais rápida e aprofundada. Por meio da metagenômica, pode-se então estabelecer a composição taxonômica da comunidade, bem como a abundância de genes microbianos em uma amostra (MAYO et al., 2014; OULAS et al., 2015; PARENTE et al., 2016).

Dessa forma, através de uma variedade de técnicas moleculares, pode-se estudar a microbiota presente em diversas variedades de queijos. Esses estudos, por sua vez, podem servir como base para melhores previsões quanto à qualidade, segurança e aceitabilidade que são esperadas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o perfil da comunidade bacteriana em queijos Minas Frescal industrializados e determinar o resistoma clínico e seu potencial de mobilização.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar e comparar o perfil da estrutura da comunidade bacteriana das amostras de Queijo Minas Frescal pela amplificação de sequência repetitiva extragênica palindrômica;
- Investigar e comparar o perfil de bactérias do ácido láctico das amostras de Queijo Minas Frescal por DGGE;
- Detectar a ocorrência de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas de interesse clínico humano por PCR a partir DNA metagenômico obtidos das amostras de Queijo Minas Frescal;
- Avaliar a ocorrência de integrons classes 1, 2 e 3 por PCR a partir DNA metagenômico obtidos das amostras de Queijo Minas Frescal.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

A estratégia experimental está descrita no fluxograma (Figura 4).

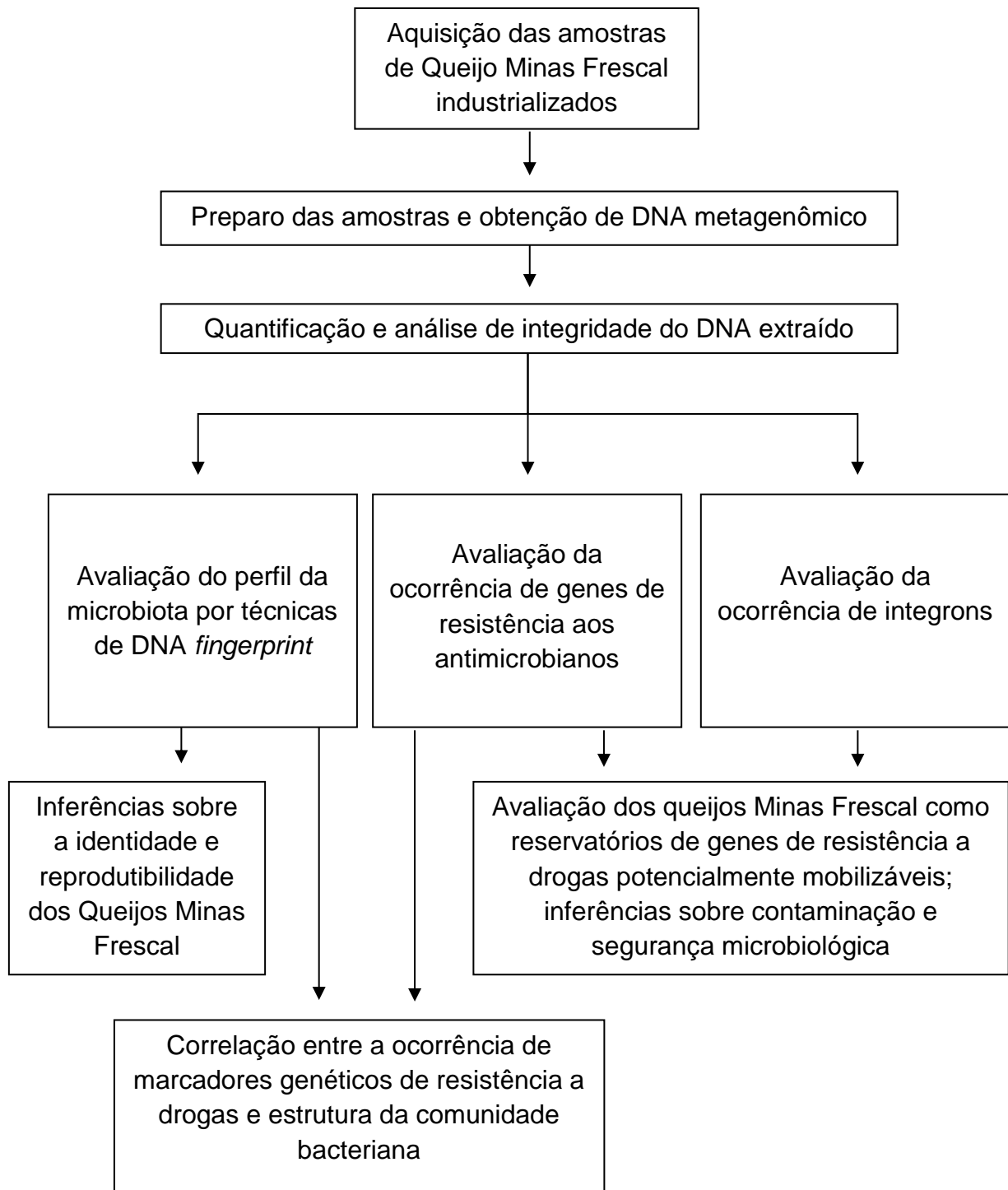


Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental

## 4.2 Processamento das amostras e extração do DNA

Foram obtidas 35 amostras de queijo Minas Frescal (QMF), compreendendo 7 marcas industrializadas (classificadas como A, B, C, D, E, F e G), sendo 5 amostras do mesmo lote de cada marca. Todos os queijos avaliados no presente trabalho continham o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), estavam sob refrigeração e foram adquiridos no varejo da cidade de Juiz de Fora/MG. As amostras foram transportadas em caixa de material isotérmico até o laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo mantidas sob refrigeração até o momento das análises (máximo 2 horas). A desinfecção da embalagem foi realizada com álcool 70% antes da abertura.

De forma a amostrar vários pontos da superfície e do interior dos queijos, foi obtida uma amostra de 25 g a partir de fragmentos de cada queijo, que foi posteriormente macerada em uma placa de Petri estéril com auxílio de uma espátula e solubilizada em 225 mL de citrato de sódio 2% (w/v), sob agitação constante, por 30 minutos a temperatura ambiente. A partir do volume total, 50 mL da suspensão foi centrifugada a 14.000x *g* por 10 minutos e o sobrenadante contendo a camada de gordura foi descartado. O *pellet* obtido foi solubilizado em 10 mL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0) e centrifugado a 14.000x *g*. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspenso em 2 mL de TE e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 µL de TE.

O DNA total foi extraído a partir do *pellet* solubilizado em 200 µL de TE, usando o kit comercial *QIAamp™ DNA Stool Mini Kit*, de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração do DNA metagenômico foi determinada por fluorimetria usando-se o fluorímetro Qubit™ 2.0®, com o kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* (Life Technologies, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl-Borato-EDTA). O gel foi corado com brometo de etídio e analisado em transluminador de luz ultravioleta (GE *Healthcare*, Reino Unido). O DNA extraído foi aliquotado e armazenado em freezer a -70°C.

### 4.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana dos queijos por técnicas de *fingerprint de DNA*

O perfil das comunidades microbianas presentes nas amostras de queijos foi avaliado pela técnica de rep-PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

#### 4.3.1 Rep-PCR

As análises por rep-PCR foram feitas usando o DNA total extraído diretamente das amostras. As reações foram realizadas de acordo com Gaber e colaboradores (2015), com algumas modificações, usando um único oligoiniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). A concentração final da reação de PCR continha 1x Master Mix (Promega Corporation), 0,8 µM do *primer*, 20 ng de DNA e água de PCR ultrapura (Promega Corporation) foi adicionada para completar um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador automatizado (Biometra T1 *Thermal Cycler*, Gttingen, Alemanha) programado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2,5 minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os *amplicons* foram separados em gel de agarose 2% usando tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), por 2 horas a 100 volts. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (GE *Healthcare*, Reino Unido). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA *ladder* (Promega, Madison, WI, USA).

As análises de *fingerprints* foram realizadas utilizando o programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). O dendrograma foi construído com base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) para análise dos agrupamentos.



### 4.3.2 PCR-DGGE para o grupo de bactérias lácticas

Fragmentos do gene codificador do RNAr 16S de representantes do grupo de bactérias do ácido láctico foram amplificados de acordo com ENDO e OKADA (2005), com algumas modificações. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 2. O par de *primers* Lac1 / Lac2GC é específico para os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc* e o par Lac3 / Lac2GC específico para *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Vagococcus* spp. e *Tetragenococcus* spp. O iniciador Lac3 anela na mesma posição que Lac1 e ambos formam fragmentos de 340 pares de bases da região V3 do gene RNAr 16S.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* usados para amplificar fragmentos de genes 16S DNAr

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Alvo	Referência
Lac 1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	DNAr 16S (V3) do grupo BAL: <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> e <i>Weissella</i>	ENDO e OKADA, 2005
Lac 2 <sup>GC</sup>	CGCCCGGGGC- GCGCCCCGGGCGGCC- GGGGGCACCGGGGGAT- TYCACCGCTACACATG	DNAr 16S do grupo BAL	ENDO e OKADA, 2005
Lac 3	AGCAGTAGGGAATCTTCGG	DNAr 16S (V3) do grupo BAL: <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> e <i>Vagococcus</i>	ENDO e OKADA, 2005

O volume das reações de PCR foram de 25 µL, contendo 1x Master Mix (Promega Corporation), 0,4 µM do *primer*, 20 ng de DNA e o volume completado com água de PCR ultrapura (Promega Corporation). A amplificação foi realizada em

termociclador automatizado (Biometra T1 *Thermal Cycler*, Gttingen, Alemanha) programado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54° por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72° por 7 minutos.

#### 4.3.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “*DCode™ Universal Mutation Detection System*” (BioRad – Califórnia, USA).

Foram aplicados 20 µL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida: N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 35% a 55% para a análise dos fragmentos. O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 *Gradient Delivery System* – BIO-Rad Califórnia, USA), uma com 35% e a outra com 55% dos agentes desnaturantes (uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v)). Além das soluções estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletileno diamino) (catalisador) e 50mL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de três horas.

Uma mistura de fragmentos de DNAr 16S amplificados das seguintes espécies foram utilizadas como controles: *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecalis*.

A eletroforese foi realizada em temperatura de 60°C e voltagem constante de 50V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de *SYBER® Gold* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no transluminador ultravioleta (GE *Healthcare*, Reino Unido) e salvas no formato TIF.

As análises de *fingerprints* foram realizadas utilizando o programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). O dendrograma foi construído com

base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) para análise dos agrupamentos.

#### 4.4 Detecção dos genes de resistência e integrons

O resistoma clínico avaliado nesse estudo é composto de um conjunto de 40 marcadores genéticos de resistência, incluindo marcadores de resistência relacionados a bombas de efluxo e integrons de classes 1, 2 e 3 (Tabela 3). Os marcadores de resistência foram pesquisados a partir do DNA metagenômico extraído das amostras de queijo por PCR convencional, utilizando *primers* específicos e condições de amplificação já descritas na literatura (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 1 X Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL de DNA (~20 ng/µL). A concentração do *primer* variou de acordo com a referência usada e o volume foi completado com água. As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Biometra T1 *Thermal Cycler*, Göttingen, Alemanha). Após eletroforese em gel de agarose 1,5%, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador ultravioleta (GE *Healthcare*, Reino Unido). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA *ladder* (Promega, Madison, WI, USA).

O branco foi realizado a partir de reações sem DNA molde. Para um controle positivo, os *amplicons* foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.) e os fragmentos de DNA obtidos foram sequenciados em um sequenciador ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas contra um banco de dados de nucleotídeos (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Para avaliar o perfil de agrupamento das amostras baseado na ocorrência de marcadores de resistência aos antibióticos, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) usando o programa PAST.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos dos fragmentos esperados e referências.

Gene Alvo	Antimicrobiano	Sequência (5' – 3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Beta-lactâmico	ATG TGC AGY ACC AGT AAA G GGT CAC CAG AAG GAG C	562	Jones et al.,2009
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	Beta-lactâmico	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	892	Jones et al.,2009
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Beta-lactâmico	CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC	982	Jones et al.,2009
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Beta-lactâmico	GTG CGC GGA ACC CCT ATT TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	968	Jones et al.,2009
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	Beta-lactâmico	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	Woodford et al.,2006
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	Beta-lactâmico	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	Woodford et al.,2006
<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	Beta-lactâmico	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	Woodford et al.,2006
<i>bla<sub>OXA-143</sub></i>	Beta-lactâmico	TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC	149	Higgins et al.,2010
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	Beta-lactâmico	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	Woodford et al.,2006
<i>bla<sub>Z</sub></i>	Beta-lactâmico	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	Martineu et al., 2000
<i>cfxA/cfxA2</i>	Beta-lactâmico	CGT AGT TTT GAG TAT AGC TTT GAT GTT GCC TAT ATA TGT C	802	Morin, Madinier e Fosse, 2003

Tabela 3. Continuação...

<i>ampC</i>	Beta-lactâmico	ATA ACC ACC CAG TCA CGC CAG TAG CGA GAC TGC GCA	630	Odeh et al., 2002
<i>blaSPM-1</i>	Beta-lactâmico	CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	649	Gales et al., 2003
<i>cfiA</i>	Beta-lactâmico	TCC ATG CTT TTC CCT GTC GCA GTT AT GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC	683	Sóki et al., 2004
<i>tet(A)</i>	Tetraciclina	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	210	Ng et al., 2001
<i>tet(B)</i>	Tetraciclina	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	659	Ng et al., 2001
<i>tet(E)</i>	Tetraciclina	AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG	278	Ng et al., 2001
<i>tet(K)</i>	Tetraciclina	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	360	Strommenger et al., 2003
<i>tet(L)</i>	Tetraciclina	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	267	Ng et al., 2001
<i>tet(M)</i>	Tetraciclina	AGT GGA GCG ATT ACA GAA CAT ATG TCC TGG GGT GTC TA	158	Strommenger et al., 2003
<i>tet(O)</i>	Tetraciclina	AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC CGG CGG GGT TGG CAA ATA	1723	Trzcinski et al., 2000
<i>tet(Q)</i>	Tetraciclina	TTA TAC TTC CTC CGG CAT CG ATC GGT TCG AGA ATG TCC AC	904	Ng et al., 2001

Tabela 3. Continuação...

<i>mrsA</i>	Meticilina	TCC AAT CAT AGC ACA AAA TC AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT	163	Chaieb et al., 2007
<i>mecA</i>	Meticilina	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	Zhang et al., 2004
<i>ereA</i>	Eritromicina	AAC ACC CTG AAC CCA AGG GAC G CTT CAC ATC CGG ATT CGC TCG A	420	Sutcliffe et al., 1996
<i>ereB</i>	Eritromicina	AGA AAT GGA GGT TCA TAC TTA CCA CAT ATA AAT CAT CAC CAC CAA TGG CA	546	Sutcliffe et al., 1996
<i>mphA</i>	Eritromicina	AAC TGT ACG CAC TTG C GGT ACT CTT CGT TAC C	837	Sutcliffe et al., 1996
<i>ermA</i>	MLS*	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	190	Strommenger et al., 2003
<i>ermB</i>	MLS*	CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATG AAA GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	142	Martineau et al., 2003
<i>ermC</i>	MLS*	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG	299	Strommenger et al., 2003
<i>qnrB</i>	Quinolona	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG ATG AGC AAC GAT GCC TGG TA	476	Kim et al., 2009
<i>qnrS</i>	Quinolona	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	428	Kim et al., 2009
<i>sul1</i>	Sulfonamida	ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT CTG A CTA GGC ATG ATC TAA CCC TCG GTC T	815	Grape, SundstromKronvall, 2003

\*Macrólido, Lincosamida e estreptoGramina

Tabela 3. Continuação...

<i>sul2</i>	Sufinamida	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT	396	Hindi, Shubbar e Addos,2013
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglicosídeo	TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA	227	Strommenger et al.,2003
<i>vgb</i>	MLS	ACT AAC CAA GAT ACA CAG GAC C TTA TTG CTT GTC AGC CTT CC	734	Lina et al.,1999
<i>cepA</i>	MLS	TTT CTG CTA TGT CCT GCC C ATC TTT CAC GAA GAC GGC	743	Nakano et al.,2011
<i>mexB</i>	**	GTG TTC GGC TCG CAG TAC TC AAC CGT CGG GAT TGA CCT TG	244	Yoneda et al.,2005
<i>mexD</i>	**	CGA GCG CTA TTC GCT GC CGA GCG CTA TTC GCT GC	165	Xavier et al.,2010
<i>mexF</i>	**	GGC AGT TGC ACG TCG A CGC CTG GTC ACC GAG GAA GAG T	255	El Amin et al.,2005
<i>mexY</i>	**	TAG TCC ATG GCT TGC GGG AAG C CCG CTA CAA CGG CTA TCC CT	250	Yoneda et al.,2005
<i>intI1</i>	Integron Classe 1	GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	436	Machado et al., 2005
<i>intI2</i>	Integron Classe 2	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG TGTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	788	Machado et al., 2005
<i>intI3</i>	Integron Classe 3	AGT GGG TGG CGA ATG AGT G TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG	600	Machado et al., 2005

\*\* Bombas de efluxo que conferem resistência cruzada a diferentes drogas antimicrobianas

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação comparativa da similaridade da estrutura global da comunidade bacteriana por rep-PCR

O rep-PCR foi considerado neste estudo como um método independente de cultivo, usando o DNA total extraído das amostras de queijo para comparar o perfil da comunidade microbiana entre as amostras de marcas diferentes e entre amostras de uma mesma marca (mesmo lote). O *fingerprint* obtido a partir da amplificação de fragmentos repetitivos do genoma bacteriano por rep-PCR é apresentado na Figura 5 e o dendrograma obtido pelo agrupamento das amostras de queijos, na Figura 6.

Em geral, considerando um coeficiente de similaridade maior que 80%, as amostras foram claramente agrupadas de acordo com suas respectivas marcas. Quando comparados visualmente, os perfis de bandas obtidos no gel para as amostras de mesma marca, de fato mostraram-se altamente similares em termos de número e posições relativas das bandas (Figura 5). Todas as amostras das marcas B, C e G e algumas amostras das marcas A (Q1A e Q2A; Q3A, Q4A e Q5A), F (Q26F e Q27F; Q29F e Q30F), E (Q21E e Q22E) e D (Q16D, Q17D, Q19D e Q20D) agruparam-se com um coeficiente de 100% de similaridade. Esses resultados sugerem uma boa reprodutibilidade e homogeneidade da amostragem utilizada nesse estudo no que se refere a estrutura da sua microbiota.

Apesar de estarem agrupadas em um mesmo *cluster*, algumas amostras das marcas A, E, F e D foram subdivididas, mas em geral, apresentaram índices de similaridade maiores que 80%. Em contrapartida, a amostra Q23E não foi agrupada no mesmo *cluster* da marca E, apresentando um índice de aproximadamente 55% de similaridade com relação às demais amostras da mesma marca. Diferenças no seu padrão de bandeamento, de fato, puderam ser visualizadas no gel.

As análises para comparação da estrutura da comunidade microbiana entre as amostras de marcas diferentes revelaram que as marcas G e A apresentaram os perfis mais próximos, com 77% de similaridade entre si e com 66% em relação a marca B. A marca D apresentou o perfil mais diferente, com um índice de similaridade menor que 25% em relação às demais, seguida da marca C, que apresentou 48% de similaridade.





## 5.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

O *fingerprint* obtido nos experimentos de PCR-DGGE permitiu avaliar a estrutura da comunidade de bactérias do ácido láctico nas amostras de queijo Minas Frescal analisadas. O dendrograma obtido (Figura 7) mostrou claramente que os agrupamentos por PCR-DGGE para o grupo de bactérias lácticas foram regidos pelas marcas analisadas. De maneira geral, as amostras de mesma marca se agruparam em *clusters* com mais de 68% de similaridade e todas as marcas apresentaram amostras que se agruparam com 100% de similaridade. As únicas exceções foram as amostras Q4A e Q30F, que não se agruparam com as demais amostras das marcas A e F respectivamente.

A similaridade entre as marcas foi considerada pequena. As amostras das marcas A e F foram as que apresentaram perfis mais próximos, com aproximadamente 46% de similaridade. As amostras da marca G foram agrupadas em um cluster separado e apresentaram perfis que mais se diferenciaram das demais amostras (similaridade menor que 20%).



Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados da variável riqueza para grupos de bactérias lácticas.

Parâmetros	Marcas						
	A	B	C	D	E	F	G
Nº de observações	5	5	5	5	5	5	5
Mínimo de bandas	5	6	5	5	5	4	2
Máximo de bandas	5	7	6	5	7	5	3
Média de bandas	5,00	6,80	5,80	5,00	6,60	4,60	2,20
Desvio Padrão	0	0,45	0,45	0	0,89	0,55	0,45

### 5.3 Detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos

O resistoma clínico avaliado nesse estudo é composto por marcadores genéticos de resistência representativos de antimicrobianos de uso corrente na medicina humana e animal no Brasil. Do total de 40 marcadores investigados, 19 foram detectados, os quais estão relacionados a tetraciclinas, beta-lactâmicos, sulfonamidas, quinolonas e aminoglicosídeos (Figura 8). Também foram detectados marcadores relacionados a presença de bombas de efluxo ativo, que podem conferir resistência cruzada a diferentes classes de antibióticos. Por outro lado, os marcadores de resistência relacionados a macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas e eritromicinas não foram detectados em nenhuma amostra avaliada.

Em particular, o gene para beta-lactamase *blaZ* foi detectado em 100% das amostras e os genes *tetB*, *bla<sub>TEM</sub>*, *sul1* e *sul2*, em mais de 80% das amostras. Apesar da alta porcentagem de ocorrência, apenas 3 marcadores de resistência relacionados aos beta-lactâmicos foram detectados, representando 10% do total de marcadores avaliados para essa classe farmacológica (14 marcadores). Os marcadores de resistência relacionados as tetraciclinas foram os mais prevalentes entre as amostras. Todos os marcadores avaliados nesse estudo para essa classe farmacológica, foram detectados entre as amostras, apesar da baixa ocorrência do gene *tetO*.

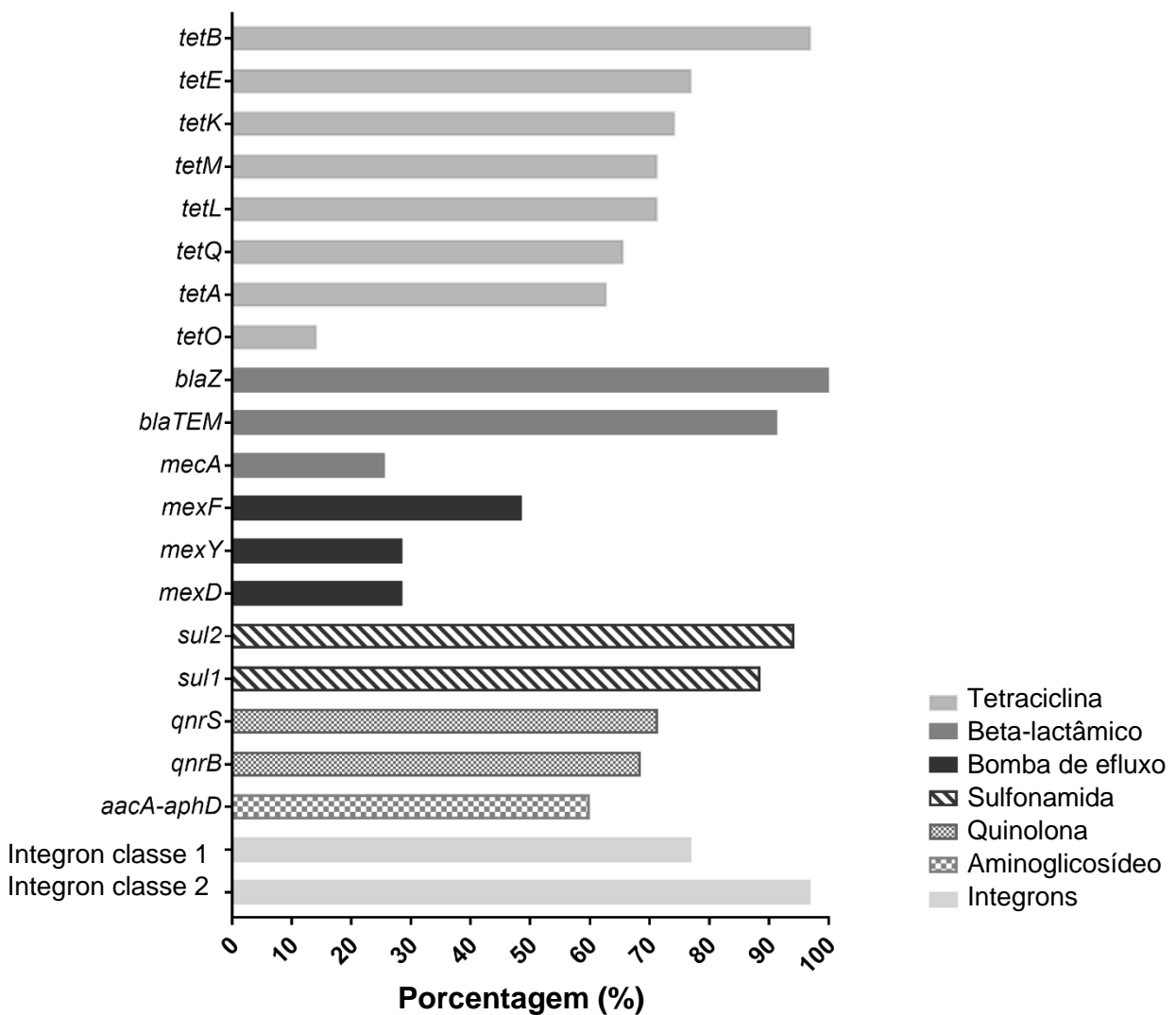


Figura 8. Frequência de detecção dos marcadores genéticos de resistência

Cada marca de queijo avaliada apresentou um perfil de ocorrência de marcadores de resistência particular e a ocorrência simultânea de marcadores diferentes pôde ser observada em uma mesma marca (Figura 9). Em geral, a frequência de detecção e a variedade de marcadores foram maiores entre as amostras da marca D e menores na marca C. Apesar disso, um núcleo comum de marcadores de resistência, relacionados a tetraciclinas, beta-lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas (*tetB*, 155 *bla-TEM*, *blaZ*, *qnrS*, *sul1* and *sul2*) foi detectado em todas as marcas (Figura 9). Em concordância com o agrupamento obtido por rep-PCR, as amostras também foram agrupadas por marcas de acordo com o perfil de ocorrência de marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos (Figura 10).

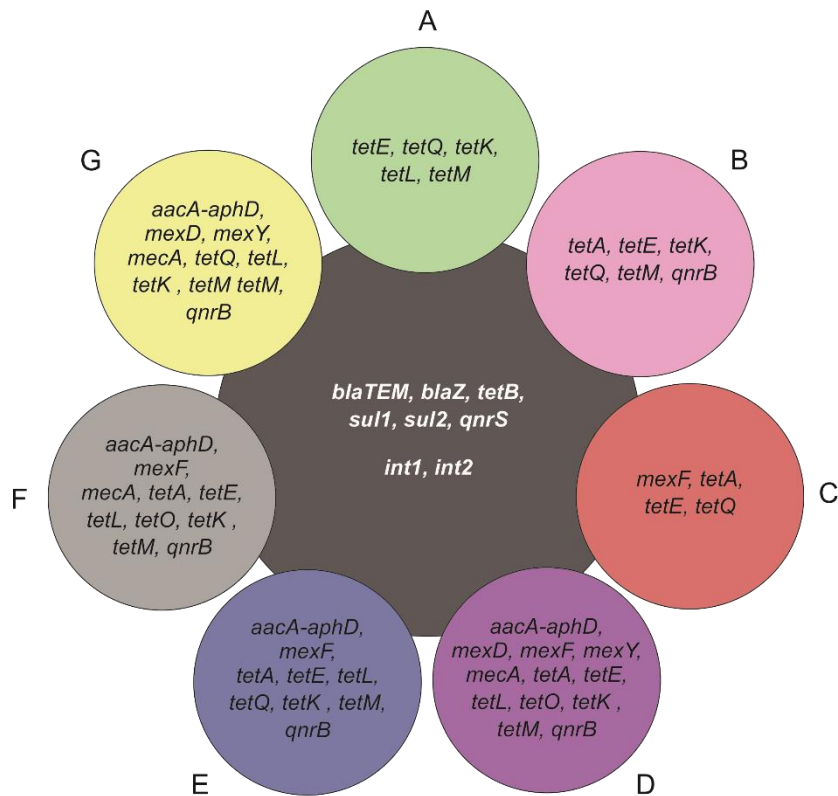


Figura 9. Perfil de ocorrência dos marcadores genéticos de resistência e integrons entre as marcas de queijos. A a G: marcas de queijo

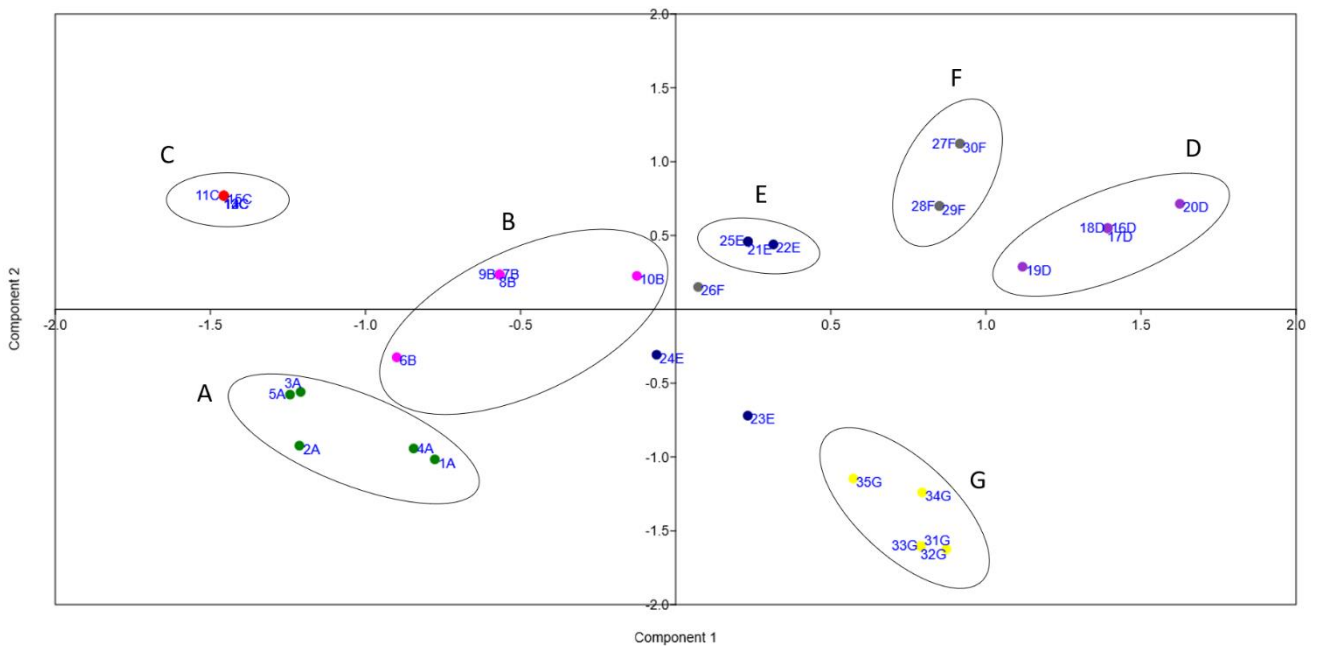


Figura 10. Agrupamento das amostras de queijo baseado na ocorrência dos marcadores genéticos de resistência, utilizando uma análise de componente principal (PCA)

A avaliação da presença de integrons baseada na PCR foi realizada para as 35 amostras desse estudo, utilizando primers específicos para 3 diferentes genes *intI* (*intI1*, *intI2* e *intI3*). Integrons das classes 1 e 2 foram detectados em 77% e 97% das amostras respectivamente, e também caracterizaram o núcleo comum de genes detectados em todas as marcas (Figuras 8 e 9). Integrons de classe 3 não foram detectados entre as amostras.

## 6. DISCUSSÃO

Muitos estudos relacionados ao queijo Minas priorizam suas características tecnológicas e sensoriais ou a ocorrência de microrganismos específicos utilizando metodologias de cultivo. No entanto, estima-se que cerca de 99% dos microrganismos presentes na natureza não sejam cultiváveis usando técnicas convencionais (Perin et al., 2017). A caracterização do perfil da microbiota usando métodos dependentes de cultivo pode subestimar a diversidade microbiana de ambientes complexos. As células estressadas e lesadas não são identificadas e a seletividade excessiva de alguns meios pode não permitir o crescimento de algumas populações microbianas menos abundantes.

Nos últimos anos, metodologias independentes de cultivo baseadas em técnicas de biologia molecular têm sido empregadas para o estudo da microbiota de diferentes queijos com diversas finalidades: detecção e identificação de microrganismos, avaliação da qualidade microbiológica, interferência de tecnologias de produção, comparação do perfil da microbiota entre diferentes amostras, distinção de origem geográfica, dentre outras aplicações. Em particular, as técnicas de *fingerprint* de DNA, muitas vezes caracterizadas como de baixa resolução, são capazes de gerar impressões genéticas globais que permitem a análise da relação genômica entre amostras e a comparação de padrões de DNA. Essa técnica tem múltiplas aplicações em diferentes campos, incluindo na indústria de alimentos (HERAS et al., 2016)

A abordagem de rep-PCR é normalmente empregada para diferenciar e agrupar isolados bacterianos a partir da geração de *fingerprints* de DNA, podendo ser empregada como um rastreio prévio para posterior identificação por sequenciamento. No entanto, alguns estudos têm reportado que a técnica de rep-PCR também é uma ferramenta importante para avaliar a similaridade global entre a microbiota de diferentes matrizes de alimentos. Perin et al. (2015), utilizando a técnica de rep-PCR de forma independente de cultivo, demonstraram claramente as diferenças entre o perfil da microbiota de dois tipos de queijos Minas produzidos por diferentes tratamentos. Perin et al. (2017), através da mesma abordagem, avaliaram as diferenças entre a microbiota de 5 variedades de queijo Minas artesanal produzidos em diferentes regiões de Minas Gerais. No presente estudo, a análise por rep-PCR também foi empregada como um método independente de cultivo, utilizando o DNA



total extraído das amostras de queijo. Segundo nosso conhecimento, esse tipo de abordagem foi empregada apenas para comparação da microbiota de queijos artesanais, sendo este o primeiro relato para queijos produzidos industrialmente.

A alta similaridade dos *fingerprints* de DNA gerados por rep-PCR entre amostras produzidas em mesmo lote, sugere que houve uma padronização no processo produtivo e que as variações inerentes ao processo industrial foram mínimas, resultando em amostras altamente homogêneas e reproduzíveis. Esse resultado está de acordo com o esperado, considerando que produtos de um mesmo lote são processados pelo mesmo fabricante, em um espaço de tempo determinado, utilizando mesma matéria prima e sob condições essencialmente iguais (BRASIL, 2002).

A amostra 23 da marca E representou a única exceção, considerando que não foi agrupada no mesmo *cluster* das demais amostras da mesma marca. Embora essa amostra apresentasse o mesmo número de lote, o rótulo constava que sua fabricação foi realizada 4 dias antes da data de fabricação das demais. Essas informações podem suscitar questões a respeito do controle de qualidade, da origem da matéria prima e dos suplementos utilizados na produção dessas amostras de queijo. Além disso, sabe-se que as próprias características do queijo Minas Frescal, como elevada umidade e ausência de conservantes, favorecem alterações microbiológicas durante o período de estocagem, o que também poderia fundamentar as diferenças observadas no perfil microbiano da amostra 23E em comparação com as demais amostras da mesma marca. Em estudo realizado por Sangaletti et al. (2009), análises microbiológicas demonstraram alterações nas populações microbianas em queijos Minas Frescal ao longo do período de estocagem por 30 dias, ratificando que mudanças no perfil microbiano podem ocorrer.

Apesar dos perfis microbianos entre as marcas terem se mostrado altamente similares quando comparados visualmente, de uma maneira geral as 7 marcas avaliadas apresentaram alguma heterogeneidade entre si, considerando que o índice de similaridade entre elas variou de 23% a 77%. Embora tenham sido adquiridos no varejo da cidade de Juiz de Fora, os queijos de cada marca analisada no estudo foram produzidos em diferentes laticínios na região da Zona da Mata, além de apresentar datas de fabricação diferentes. Apesar de implementar etapas de produção similares, as quais são preconizadas pela legislação para a produção do queijo Minas Frescal, variabilidades inerentes a matéria-prima, ao processo tecnológico de cada laticínio e

as condições de armazenamento, influenciam diretamente o perfil da microbiota dos queijos, justificando os diferentes perfis microbianos observados entre as marcas. Um trabalho realizado por Rocha, Buriti e Saad (2006) evidenciou a falta de padronização entre amostras de queijo Minas Frescal de 7 marcas diferentes adquiridas em supermercados, baseada em parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Por outro lado, com exceção das marcas D e C avaliadas no presente estudo, os níveis de similaridade entre as marcas foram maiores que 57%, sugerindo a ocorrência de um núcleo comum na estrutura microbiana dos queijos Minas Frescal.

Desde a sua introdução na ecologia microbiana no início da década de 1990, a técnica de DGGE tornou-se um dos métodos moleculares mais amplamente explorados para a investigação da diversidade microbiana de ecossistemas alimentares, incluindo queijos (AQUILANTE et al., 2016). Uma aplicação típica da técnica de DGGE é a identificação de produtos alimentares, de acordo com a sua origem geográfica. Arcuri et al. (2013) foram os primeiros autores a reportarem o uso dessa abordagem para o estudo da ecologia bacteriana em queijos Minas. A análise de agrupamento dos padrões de DGGE obtidos por Arcuri et al. (2013) revelou uma clara separação de amostras de queijos Minas artesanais de acordo com a sua região de origem, sugerindo o potencial de PCR-DGGE como um sistema de controle e certificação.

Embora um grande enfoque tenha sido dado a estudos voltados para a diferenciação de queijos artesanais, os resultados do presente estudo sustentam a ideia de que a abordagem de PCR-DGGE também pode ser utilizada para diferenciar queijos industriais fabricados em diferentes laticínios. Semelhantemente ao agrupamento obtido pela técnica de *fingerprint* rep-PCR, as amostras avaliadas também foram separadas de acordo com suas respectivas marcas de fabricação. A elevada similaridade entre a maioria das amostras do mesmo lote, novamente revelou que elas são reprodutíveis e homogêneas. Em um estudo realizado por Aquilante et al. (2016), a análise PCR-DGGE do DNA extraído diretamente de queijos feitos tanto com leite *in natura*, como com leite pasteurizado, também demonstrou uma boa similaridade dos *fingerprints* obtidos entre queijos produzido a partir do mesmo lote de leite, referidos como réplicas.

A abordagem de PCR-DGGE foi aplicada nesse estudo para caracterizar e comparar o perfil da microbiota em relação as BAL presente nas amostras avaliadas, considerando que a estrutura microbiana global das amostras foi caracterizada por

rep-PCR. O uso de oligoiniciadores gênero-específicos ou grupo-específicos em PCR-DGGE, melhora o limite de detecção e facilita a análise da diversidade de apenas um grupo bacteriano direcionado (TEMMERMAN, HUYS e SWINGS, 2004). Os oligoiniciadores específicos utilizados no PCR-DGGE, foram projetados em estudos anteriores e desde então, tem demonstrado aplicações para analisar a diversidade de bactérias lácticas em diversos alimentos fermentados como vinho, leite, cerveja, farinha de milho, grãos de cacau (WALTER et al., 2001; ENDO e OKADA, 2005; MIYAMOTO et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ENDO, FUTAGAWA-ENDO e DICKS, 2011; MAYRHOFER et al., 2014; ALIOUA et al., 2016). Até o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da aplicação de oligoiniciadores específicos para bactérias lácticas no estudo da microbiota de queijos.

Assim, neste estudo os padrões de DGGE obtidos entre as amostras de diferentes marcas, mostraram-se bem diferentes, apresentando índices de similaridades inferiores a 50%. Esses resultados nos permitem levantar algumas considerações a respeito dos efeitos da pasteurização, assim como das diferenças no processo de fabricação sobre a composição da comunidade de bactérias do ácido láctico, além de vieses relacionados e inerentes à técnica de PCR-DGGE.

De acordo com o Regulamento Técnico para Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997 e 2004), a produção do Queijo Minas Frescal pode ser complementada ou não com a adição de bactérias lácticas específicas. Para ilustrar as variações na sua fabricação, pode-se citar: a adição de fermento láctico para acidificação; a acidificação por ácido láctico; a combinação da adição de menores quantidades de fermento láctico e de ácido láctico; ou ainda, a adição apenas do agente coagulante, sem adição do fermento ou do ácido láctico. Possivelmente, algumas dessas diferenças no processamento dos queijos Minas Frescal avaliados nesse estudo, levaram diretamente a variações nas suas características microbiológicas, especialmente no que se refere a comunidade de bactérias do ácido láctico.

Além disso, a microbiota presente no leite utilizado como matéria prima para fabricação dos queijos influencia diretamente a microbiota do produto final. Ao contrário dos queijos artesanais, nos quais o leite *in natura* constitui uma importante fonte de diversidade de bactérias lácticas no produto final, os queijos industriais são fabricados a partir do leite pasteurizado. Embora a pasteurização diminua a microbiota natural do leite, algumas espécies de bactérias lácticas podem sobreviver à pasteurização, devido a sua pronunciada resistência ao calor. Em um trabalho

realizado por Delgado et al. (2013), a diversidade de bactérias termófilas foi avaliada a partir de leite *in natura* e após a sua pasteurização. Foi verificado que bactérias lácticas termófilas, além de algumas espécies mesófilas de *Enterococcus* e *Streptococcus*, sobreviveram ao processo de pasteurização. Portanto, embora o fermento láctico não seja utilizado na fabricação de queijos em alguns laticínios, populações de bactérias lácticas podem ser bem estabelecidas mesmo em queijos fabricados a partir do leite pasteurizado e compor o perfil da sua microbiota.

Segundo Ndoye et al. (2011), a lise diferencial de células microbianas e a presença de DNA amplificável a partir de células bacterianas mortas, porém intactas, podem influenciar os resultados da DGGE e, de fato, de todos os métodos baseados em PCR. Delgado et al. (2013) verificaram que perfis de DGGE obtidos para amostras de leite cru e após a sua pasteurização, foram idênticos ou muito semelhantes. Assim, concluíram que, mesmo que a maioria das bactérias lácticas mesofílicas tenham morrido após a pasteurização (como mostrado por resultados de cultivo), elas ainda contribuíam para o *pool* de DNA amplificado e revelado por PCR-DGGE. Aquilante et al. (2016), avaliando o perfil da comunidade bacteriana de queijos, observaram que algumas espécies que não foram detectadas através de cultivo, em contrapartida, foram identificadas através da abordagem DGGE usando o DNA total extraído dos queijos. Da mesma forma, há a possibilidade de que o PCR-DGGE realizada no presente estudo tenha amplificado e revelado fragmentos de DNA de bactérias lácticas provenientes do leite usado como matéria prima, mas que foram mortas durante o processo de pasteurização e portanto, na realidade não contribuem para o perfil da microbiota no produto final. Esse fator, também pode ter contribuído para acentuar a heterogeneidade entre as amostras de diferentes marcas de fabricação, considerando que foram produzidas com matérias primas distintas.

Alguns fatores limitantes da técnica de DGGE são bem conhecidos, tais como, a detecção de várias bandas para uma única espécie bacteriana, a co-migração de espécies estreitamente relacionadas e a formação de artefatos não caracterizados, que podem dificultar a identificação de bandas específicas. Apesar dessas limitações, os resultados obtidos nos permitiram caracterizar o perfil das amostras com relação as bactérias lácticas e observar claramente o agrupamento de acordo com a marca de fabricação, além de obter um bom agrupamento das amostras produzidas em um mesmo lote, assim como o esperado.

Além de serem agrupadas por marcas baseado no perfil da microbiota, as amostras também foram agrupadas por marcas baseado na ocorrência de marcadores genéticos de resistência (Figura 10), evidenciando novamente a reprodutibilidade entre elas. As técnicas moleculares também representam uma importante ferramenta no estudo do papel dos alimentos como veículos de genes de resistência. Segundo Flórez et al. (2014), a identificação de genes de resistência diretamente em amostras ambientais, ou seja, sem tendências de cultivo, pode ser útil para o conhecimento do seu resistoma. Em estudo realizado por Muziasari et al. (2016), mais de 300 pares de *primers* foram utilizados para investigar, a partir do DNA extraído de conteúdos intestinais, diversos genes de resistência que compunham o resistoma de algumas espécies de peixes cultivados em fazendas. Devirgiliis et al. (2008) investigaram a presença de genes de resistência a antibióticos específicos a partir do DNA total extraído da microbiota presente em um queijo italiano. A detecção de genes de resistência à tetraciclina e eritromicina baseada em técnicas de PCR, também foi realizada a partir do DNA total de amostras comerciais de queijos espanhol e italiano por Flórez et al. (2014).

Apesar desses e de outros relatos, poucas tentativas ainda foram feitas para analisar diretamente o número e a diversidade de genes de resistência em alimentos. No caso dos queijos Minas Frescal, a literatura mostra que a maioria dos estudos empregam abordagens metodológicas baseadas no isolamento e identificação de bactérias resistentes, algumas vezes seguidas da análise molecular de seus determinantes genéticos de resistência. Portanto, esse é um fator que limita a comparação dos resultados obtidos nesse estudo com dados da literatura. Apesar disso, o perfil do resistoma clínico nas amostras avaliadas, nos permitem levantar algumas questões quanto ao risco de contaminação microbiana e disseminação de genes de resistência ao longo da cadeia produtiva dos queijos Minas Frescal.

Os marcadores de resistência *blaZ*, *mecA* e *aacA-aphD* detectados entre as amostras avaliadas no presente estudo, foram documentados recentemente em um outro estudo realizado por Resente et al. (2018), presentes em espécies bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal industrializados. Os marcadores de resistência foram detectados em isolados de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus caseliflavus*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus epidermidis*. Importante destacar que, embora espécies de *Enterococcus* representativas do grupo de bactérias lácticas sejam

importantes na fermentação em produtos lácteos, podem também estar associados à contaminação fecal durante a fabricação. Além disso, a presença desses marcadores em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo também é preocupante, considerando que representam importantes contaminantes na indústria de queijo e agentes patogênicos significativos tanto na medicina humana quanto veterinária (RESENDE et al., 2018).

Os resultados da amplificação por PCR de vários genes de resistência clinicamente relevantes indicaram que os genes *tet*, cujo mecanismos de resistência estão associados à proteção ribossômica (*tetK*, *tetM*, *tetQ*, *tetO*, *tetL* e *tetB*) e efluxo da tetraciclina (*tetA*, *tetE*, *tetK* e *tetM*), foram os mais presentes nas amostras de queijo Minas Frescal avaliadas. Embora as tetraciclinas sejam bem conhecidas pelo seu amplo espectro de atividade para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a disseminação de genes de resistência à essa classe farmacológica, limitou o seu uso no tratamento de infecções bacterianas. Sabe-se que, embora atualmente o seu uso seja controlado, as tetraciclinas já foram amplamente utilizadas na produção pecuária em todo o mundo, o que garantiu a persistência de genes de resistência na cadeia alimentar e facilitou a sua mobilização para patógenos humanos (GROSSMAN, 2016). Genes de resistência à tetraciclina já foram anteriormente relatados em bactérias lácticas (BAL) isoladas de produtos lácteos (DIVIRGILLIS et al., 2008; HUYS et al., 2004), bem como diretamente a partir do DNA total da microbiota de queijos. Um trabalho anterior realizado por Flórez et al. (2014), reportou a ocorrência dos genes *tetK*, *tetM*, *tetL* e *tetO* detectados por PCR a partir do DNA de queijos artesanais e industriais, típicos da Espanha e Itália.

Embora o uso dos beta-lactâmicos tenha sido proibido como aditivo na alimentação animal, ainda representam antibióticos relevantes no tratamento de infecções humanas e animais. Conseqüentemente, diversos genes de resistência correspondentes têm sido descritos em bactérias isoladas de diversos gêneros alimentícios, incluindo variedades de queijos.

O gene *mecA*, detectado em 25,7% dos queijos Minas analisados neste estudo, codifica a proteína PBP2A, a qual tem baixa afinidade para antibióticos beta-lactâmicos, como meticilina e penicilina. O gene *mecA* é um importante marcador de resistência em espécies de *Staphylococcus* e está localizado em um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec) (GOMROKI, MOHAMMED E MALLA, 2015). A relativa facilidade de transferência

deste elemento genético seria umas das explicações para a resistência crescente a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Um trabalho realizado por Fontes et al. (2013), reportou a presença do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativos isolados de queijos Minas Frescal industrializados, também coletados na cidade de Juiz de Fora.

O gene de resistência à penicilina *blaZ*, obteve a maior porcentagem de ocorrência entre as amostras avaliadas no presente estudo (100%). Além da presença da proteína PBP2A codificada pelo gene *mecA*, outro mecanismo importante que confere resistência à penicilina em espécies de *Staphylococcus* é a produção da enzima beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, que por sua vez pode estar localizado em plasmídeo ou cromossomo. A ocorrência desse gene também tem sido frequentemente relatada em *Staphylococcus aureus* isolados a partir de diferentes tipos de queijos (JAMALI et al., 2006; SPANU et al., 2012; CARFORA et al., 2015). Em conjunto com os resultados desse estudo, esses relatos suscitam questões a respeito do potencial dos queijos Minas Frescal como reservatórios de espécies de *Staphylococcus* resistentes aos beta-lactâmicos.

Considerando o gene *blaTEM* um dos principais genes responsáveis pela produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), a sua alta porcentagem de ocorrência (91,4%) nos queijos Minas Frescal torna-se preocupante. As ESBLs são codificadas principalmente em elementos genéticos móveis, tais como integrons, transposons e plasmídeos, que por sua vez, são facilmente mobilizados para outras bactérias (TEKINER e ÖZPINAR, 2016). A produção de ESBLs tem sido amplamente associada a membros da família Enterobacteriaceae, muitas dos quais apresentam relevância clínica e relação com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não. Além disso, a presença enterobactérias está frequentemente associada a práticas de higiene precárias na manipulação de alimentos de origem animal. A presença do gene *blaTEM* em queijos já foi relatada anteriormente por Amador et al. (2009), o qual foi detectado em isolados pertencentes a família Enterobacteriaceae.

A presença do gene de resistência a aminoglicosídeos (*aacA-aphD*) em 60% das amostras de queijo também é preocupante em virtude do uso controlado deste agente antimicrobiano. A presença de genes associados à resistência aos aminoglicosídeos em estafilococos coagulase-negativos isolados a partir de amostras de queijos típicos da Turquia, foi anteriormente relatado por Kürekci et al. (2016). Os aminoglicosídeos são uma das opções de terapia mais utilizadas em tratamento de infecções graves em seres humanos. O seu uso na produção animal foi rigorosamente

regulado para evitar a seleção e disseminação de bactérias resistentes a aminoglicosídeos. No entanto, de acordo com Jaimee e Halami, o aumento global dos relatos de bactérias de ácido láctico (BAL) resistentes a aminoglicosídeos isoladas a partir de fontes alimentares, pode levantar questões a respeito do seu uso continuado na criação de animais.

A elevada ocorrência de genes de resistência a quinolonas *qnrB* e *qnrS* (68,6% e 71,4%, respectivamente) e os genes de resistência a sulfonamida *sul1* e *sul2* (88,6% e 94,3%, respectivamente) entre as amostras avaliadas nesse estudo também são de particular interesse. Até o nosso conhecimento, quase não há relatos sobre a ocorrência desses genes de resistência em queijos. Curiosamente, o grupo de genes *qnr* está relacionado a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (RODRÍGUEZ-MARÍNIZ et al., 2011) e a resistência a sulfonamidas tem sido frequentemente atribuída à presença de genes *sul1* e *sul2* em integrons ou plasmídeos (PHUONG HOA et al., 2008; SKÖLD, 2000). Isso sugere que esses marcadores têm um grande potencial de serem transferidos horizontalmente e amplamente disseminados no meio ambiente.

Os genes *mexD*, *mexF* e *mexY* detectados nesse estudo, estão associados a expressão de bombas de efluxo multidrogas do tipo Mex. As bombas desse sistema consistem basicamente em três componentes: o transportador de membrana interna, uma lipoproteína periplásmica e um canal de membrana externa. Os genes *mexD*, *mexF*, *mexY* e *mexB* codificam o transportador e os demais componentes são codificados por outros genes. Fato interessante é que, este sistema de bomba de efluxo é um dos principais associados à resistência intrínseca em *Pseudomonas aeruginosa*, bastante caracterizado em diversos estudos (KIEVIT et al., 2001; UEDA et al., 2005; MORITA, TOMIDA e KAWAMURA, 2012; POONSUK, TRIBUDDHARAT e CHUANHUEN, 2014). A detecção desses marcadores portanto, novamente são indicadores importantes de possível contaminação na cadeia produtiva dos queijos Minas Frescal.

Embora não haja informações disponíveis para comparar os resultados, o rastreamento de genes de resistência neste estudo, forneceu informações sobre particularidades do processamento dos Queijos Minas Frescal. O agrupamento das amostras de acordo com seu perfil de marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos (Figura 10), sugere uma epidemiologia peculiar que pode estar relacionada aos diferentes níveis de qualidade e contaminação dos queijos ao longo



da cadeia produtiva em cada laticínio. Não é possível estabelecer se a contaminação microbiana está relacionada com a matéria-prima utilizada na indústria de laticínio ou relacionada ao manuseio humano. No entanto, o resistoma do QMF poderia ser preditivo da epidemiologia de resistência antimicrobiana regional.

Sabe-se que os genes que codificam a resistência antimicrobiana são frequentemente encontrados associados a elementos genéticos móveis. Neste estudo, integrons das classes 1 e 2 foram detectados em 77% e 97%, respectivamente, das amostras de queijo Minas, suscitando questões a respeito da mobilização de genes de resistência. Um integron em si, não é considerado um elemento móvel, mas os chamados integrons móveis (IM) estão associados a elementos genéticos como transposons e plasmídeos, os quais permitem a sua mobilização. Os IMs podem ser divididos em cinco classes diferentes, mas apenas as três classes investigadas neste estudo estão historicamente associadas à disseminação de genes de resistência aos antibióticos e a elementos móveis ou potencialmente móveis.

Muitos estudos científicos relatam integrons e sua associação com genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, macrolídeos e tetraciclina. A associação de alguns dos genes de resistência detectados nesse estudo com a estrutura dos integrons, já foi reportada anteriormente em outros estudos. Ribeiro et al. (2011) observaram a ocorrência do cassete *bla*<sub>TEM</sub> na estrutura de integron classe 1 presente em isolados de *Salmonella enterica* de gêneros alimentícios. Em um estudo realizado por Ahmed et al. (2014), foi encontrada uma associação positiva entre genes *qnrS* com integrons de classe 1, que também transportavam cassete gênico de resistência a aminoglicosídeos em todos os isolados de Enterobacteriaceae a partir de amostras de queijo. O gene *sul1* frequentemente é encontrado relacionado a outros genes de resistência na região conservada dos integrons de classe 1 (ESCUADERO et al., 2015).

Segundo Gillings (2017), bactérias transmitidas por alimentos podem representar caminhos importantes para o movimento de integrons para a microbiota humana. Jones-Dias et al. (2016) relataram a presença de integrons de classes 1, 2 e 3 associados a genes de resistência a antibióticos presentes no genoma de isolados Gram-negativos de frutas frescas e vegetais. Apesar desse e de outros relatos, ainda há carência de informações com relação à ocorrência e prevalência de integrons, bem como o papel que esses elementos genéticos desempenham na resistência

antimicrobiana em bactérias de origem alimentar, principalmente de produtos lácteos (DENG et al., 2015).

## CONCLUSÕES

- Os agrupamentos e a similaridade observada entre amostras do mesmo lote, obtidos pelas técnicas de *fingerprint* (rep-PCR e PCR-DGGE), demonstraram que as amostras são claramente homogêneas e reproduzíveis, sugerindo padronização na cadeia produtiva dos queijos de cada marca de mesmo lote.
- A técnica de rep-PCR, embora seja amplamente utilizada para comparar perfis clonais microbianos e agrupá-los por similaridade genética, mostrou-se uma ferramenta útil para comparação entre o perfil da comunidade microbiana de amostras de alimentos de forma independente de cultivo.
- As diferenças observadas na estrutura da comunidade microbiana entre diferentes marcas podem levantar questões sobre: padronização das tecnologias de produção entre diferentes laticínios; origem dos suprimentos para a fabricação dos queijos, em especial o leite; contaminações qualitativa e quantitativa ao longo da cadeia produtiva. Esses fatores podem contribuir para gerar diferentes perfis na comunidade microbiana do produto final.
- Com a necessidade de novos estudos prospectivos e complementares, nossos dados confirmam que a cadeia produtiva do Queijo Minas Frescal pode atuar como reservatório de bactérias putativas resistentes aos antibióticos com grande impacto na saúde humana.
- A ocorrência dos genes de resistência observados é de especial interesse devido à sua relevância clínica. Além disso, a correlação entre os marcadores detectados e os grupos microbianos associados a esses marcadores levantam questões a respeito de possíveis contaminações durante a fabricação de Queijos Minas Industrializados, elaborados a partir de leite pasteurizado. Esses dados, portanto, apontam para a necessidade de discussão dos parâmetros de qualidade microbiológica na produção, armazenamento e distribuição de QMF.

- O agrupamento das amostras de queijo dentro das suas marcas (fabricantes) segundo seu perfil de marcadores genéticos associados à resistência aos antimicrobianos permite sugerir que, do ponto de vista epidemiológico, a microbiota dos queijos reflete contaminação microbiana inerente aos ambientes e processos produtivos associados.
- O estudo de alimentos como reservatório de resistência a antimicrobianos pode contribuir para o entendimento das rotas de disseminação, epidemiologia e extensão do fenômeno.
- A presença de integrons sugere que os Queijos Minas Frescal podem atuar na dinâmica do movimento de integrons para a microbiota humana, contribuindo portanto, para a transferência horizontal de genes de resistência para nossa microbiota transitória e residente.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Informações sobre tipos de queijo no Brasil**. Disponível em: <www.abiq.com.br>. Acesso em: 15/02/2017.
- AHMED, A.M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 189, p. 39–44, 2014.
- ALESSANDRIA, V.; FERROCINO, I.; FILLIPIS, F.; FONTANA, M.; RANTSIOU, K.; ERCOLINI, D.; COCOLIN, L. Microbiota of an Italian Grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3988–3995, 2016.
- ALIOUA, S.; ABDI, A.; FHOULA, I.; BRINGEL, F.; BOUDABOUS, A.; OUZARI, I. H. Diversity of Vaginal Lactic Acid Bacterial Microbiota in 15 Algerian Pregnant Women with and without Bacterial Vaginosis by using Culture Independent Method. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 9, 2016.
- AMADOR, P.; FERNANDES, R.; PRUDÊNCIO, C.; BRITO, L. Resistance to  $\beta$ -lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 1538–1551, 2009.
- AMORIM, A. L. B. C.; COUTO, E. P.; SANTANA, A. P.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364–367, 2014.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SIMAS DOS SANTOS, G.; AMADEU ALMEIDA LAVORATO, J. Avaliação Da Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Produzido Por Laticínios Do Estado De Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433, 2014.
- AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; BABINI, V.; OSIMANI, A.; GAROFALO, C.; POLVERIGIANI, S.; CLEMENTI, F. PCR-DGGE for the profiling of cheese bacterial communities: strengths and weaknesses of a poorly explored combined approach. **Dairy Sci. & Technol.** v. 96, p. 747–761, 2016.
- ARCURI, E. F.; EL SHEIKHA, A. F.; RYCHLIK, T.; MÉTYER, I. P.; MONTET, D. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR e DGGE : Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**, v. 30, p. 1–6, 2013.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 3, p. 142–156, 2006.
- BEMFEITO, R.M.; RODRIGUES, J. F.; SILVA, J. G.; ABREU, L. R. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy**

**Science**, v. 99, n. 10, p. 7886–7897, 2016.

BHATTA, D. R.; BANGTRAKULNONTH, A.; TISHYADHIGAMA, P.; SAROJ, S. D.; BANDEKAR, J. R.; HENDRIKSEN, R. S.; KAPADNIS, B. P. Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. **Letters Applied Microbiology**, v. 44, p. 588-594, 2007.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42–51, 2015.

BLANCO, P.; HERNANDO-AMADO, S.; REALES-CALDERON, J. A.; CORONA, F.; LIRA, F.; ALCALDE-RICO, M.; BERNARDINI, A.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ, J. L. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, v. 4, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, de 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, de 08 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - **RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, de 18 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - **RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002**. Discorre sobre a rotulagem dos alimentos embalados. Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº4. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, em 01 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em: 07 Fev. 2017.

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S; MAZON, E. M. A; PISANI, B; PRANDI, M. A. G; PASSOS, H. C. R. Queijo Minas Frescal: avaliação da Qualidade e Conformidade com a Legislação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 177-85, 2004.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 141–166, 2010.

CAMBRAY, G.; SANCHEZ-ALBEROLA, N.; CAMPOY, S.; GUERIN, E.; DA RE S.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; PLOY, M. C.; BARBÉ, J.; MAZEL, D.; ERILL, I.; Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. **Mobile DNA**, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2011.

CAMPOS, M.R.J.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VIEIRA, C.A.da. S.; JAYME, L.B.; SANTOS, P.P. SERAFINI, A.B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, v.36, n.4, p. 1221-1227, 2006.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12–15, 2015.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTRO, A.; SANTOS, C.; MEIRELES, H.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 153–160, 2016.

CHAMOSA, L. S.; ÁLVAREZ, V. E.; NARDELLI, M.; QUIROGA, M. P.; CASSINI, M. H.; CENTRÓN, D. Lateral Antimicrobial Resistance Genetic Transfer is active in the open environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 513, 2017.

CHANDRAPALA, J.; ZISU, B. Novel trends in engineered milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 3, p. 268–280, 2016.

COCOLIN, L.; ALESSANDRIA, V.; DOLCI, P.; GORRA, R.; RANTSIOU, K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013.

- COCOLIN, L.; DOLCI, P.; RANTSIOU, K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 296–302, 2011.
- DA SILVA, S. D. S. P.; CIDRAL, T. A.; SOARES, M. J.; MELO, M. C. Enterotoxin-Encoding Genes in Staphylococcus spp. from Food Handlers in a University Restaurant. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 11, p. 921–925, nov 2015.
- COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI D.; MOSCHETTI, G. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 414-420, 2001.
- DAMACENO, H. F. B. et al. FREITAS, J.C.V.; MARINHO, I. L.; CUPERTINO, T. R.; COSTA, L. E.; NASCIMENTO, J. S. Antibiotic Resistance Versus Antimicrobial Substances Production by Gram-Negative Foodborne Pathogens Isolated from Minas Frescal Cheese: Heads or Tails? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 297–301, apr 2015.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.
- DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 91–102, 2016.
- DELGADO, S.; RACHID, C. T. T. C.; FERNÁNDEZ, E.; RYCHLIK, T.; ALEGRÍA, A.; PEIXOTO, R. S.; MAYO, B. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. **Food Microbiology**, v. 36, 2013.
- DE VUYST, L.; CAMU, N.; DE WINTER, T.; VANDEMEULEBROECKE, K.; VAN DE PERRE, P.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; CLEENWERCK, I. Validation of the (GTG)5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 79–90, jun 2008.
- DENG, Y.; BAO, X.; JI, L.; LEI, C.; LIU, J.; MIAO, J.; CHEN, D.; BIAN, H.; LI, Y.; YU, G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487554>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4618277>
- DEVIRGILIIS, C.; CARAVELLI, A.; COPPOLA, D.; BARILE, S.; PEROZZI, G. Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 378–384, 2008
- DEVIRGILIIS, C.; ZINNO, P.; STIRPE, M.; BARILE, S.; PEROZZI, G. Functional Screening of Antibiotic Resistance Genes from a Representative Metagenomic Library of Food Fermenting Microbiota. **BioMed Research International**, 2014.



DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARE, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 57–64, 2016.

DOYLE, M. E. Multidrug-Resistant Pathogens in the Food Supply. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 261–279, 2015.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n.1, p. 160–201, 2010.

EL AMIN, N.; GISKE, C.G.; JALAL, S.; KEIJSER, B.; KRONVALL, G.; WRETLIND, B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. **APMIS**, v. 113, p. 187–196, 2005.

EMBRAPA. Queijo Minas Frescal. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11884/2/00076200.pdf>. Acesso em: 31 de novembro 2016.

ENDO, A.; OKADA, S. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 216–221, 2005.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L. T. M. Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1085–1092, 2011.

ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3148–3155, 2013.

ESCUADERO J. A.; LOOT C.; NIVINA A.; MAZEL, D. The Integron: Adaptation On Demand. **Microbiology Spectrum**, v.3, n. 2, 2015.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, v. 42, n. 1, p. 19–33, 2013.

FELICIO, T. L.; ESMERINO, E. A.; VIDAL, V. A. S.; CAPPATO, L. P.; GARCIA, R. K. A.; CAVALCANTI, R. N.; FREITAS, M. Q.; CONDE JR, C. A.; PADILHA, M. C.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; ARELLANO, D. B.; BOLLINI, H. M. A. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628–637, 2016.

FERNANDES, A. M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 132, p. 49-56, 2006.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; LINCOPAN, N. First Report of the Globally

Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, V. 60, n. 10, p. 6415–6417, 2016.

FIELDS, F. R.; LEE, S. W.; MCCONNELL, M. J. Using Bacterial Genomes and Essential Genes for the Development of New Antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 74–86, jun 2017.

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

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 63–69, 2015.

FONTES, C. O.; SILVA, V. L.; DE PAIVA, M. R.; GARCIA, R. A.; RESENDE, J. A.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; DINIZ, C. G.; Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of *mecA*-Encoding Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Soft Cheese in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. 594–599, 2013.

FOX, P. F.; COGAN, T. M. **Factors that affect the quality of cheese**. In P. F. FOX; P. L. H. MCSWEENEY; T. M. COGAN; T. P. GUINEE (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese: An Overview**. In P. F. FOX; P. L. H. MCSWEENEY; T. M. COGAN; T. P. GUINEE (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 3. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

FRAQUEZA, M. J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p. 76–88, 2015.

FREITAS, R.; BRITO, M. A.; NERO, L. A.; DE CARVALHO, A. F. Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 951–955, 2013.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, p. 561–568, 2010.

FUKUDA, K.; OGAWA, M.; TANIGUCHI, H.; SAITO, M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities : Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. **Journal of Uoeh**, v. 38, n. 3, p. 223–232, 2016.

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

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A F; SOUZA, H. M.; MUNCK, A V. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 208, p. 13-16, 1980.

FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. **Brazilian journal of microbiology**, v. 46, n. 1, p. 201–206, mar 2015.

GABER, A.; HASSAN, M.M.; DESSOKY, E-D.S.; ATTIA, A.O. In vitro Antimicrobial Comparison of Taif and Egyptian Pomegranate Peels and Seeds Extracts. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, p. 12-17, 2015.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 699–702, 2003.

GIEDRAITIENĖ A.; VITKAUSKIENĖ A.; NAGINIENĖ R.; PAVILONIS A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, p. 137-146, 2011;

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–10, jan 2013.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present, and future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257–277, 2014.

GILLINGS, M. R. Class 1 integrons as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10–15, 2017.

GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I.; FOSSE, T. Sequence analysis of *cfxA2*-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p.1293–1296, 2003.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. D. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n. 3, p. 197–205, 2013.

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDENCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 1, p. 77-85, 2010.

- GOMROKI, F.; MOHAMMED, H. B.; MALLA, S. Amplification of Methicillin Resistant Gene (*mecA*) gene from the MRSA strains. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 3, p. 198-203, 2015.
- GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 1022–1024, 2003.
- GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- HERAS, J.; DOMÍNGUEZ, C.; MATA, E.; PASCUAL, V.; LOZANO, C.; TORRES, C.; ZARAZAGA, M. A survey of tools for analysing DNA fingerprints. **Briefings in bioinformatics**, v. 17, n. 6, p. 1–9, mar 2015.
- HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H.O. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 35, p. 305–314, 2010.
- HINDI, A.K.; SHUBBAR, E.E.; ADDOS, S.A. Molecular study on distribution of *sul-1* and *sul-2* genes among *Salmonella enterica* causing enteric fever. **Mag. Al-Kufa Univ. Biol.**, v. 5, p. 1–9, 2013.
- HUYS, G.; D'HAENE, K.; COLLARD, J.-M.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline 454 resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1555–1562, 2004.
- IMHOFF, J. New Dimensions in Microbial Ecology—Functional Genes in Studies to Unravel the Biodiversity and Role of Functional Microbial Groups in the Environment. **Microorganisms**, v. 4, n. 2, p. 19, 2016.
- JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383–388, 2006.
- JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A.; Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, p. 465–475, 2009.
- JONES-DIAS, D., MANAGEIRO, V., FERREIRA, E., BARREIRO, P., VIEIRA, L., MOURA, I. B., & CANIÇA, M. Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

KEALEY, C.; CREAVER, C. A.; MURPHY, C. D.; BRADY, C. B. New approaches to antibiotic discovery. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 6, p. 805-817, 2017.

KESMEN, Z.; YETIMAN, A. E.; GULLUCE, A.; KACMAZ, N.; SAGDIC, O.; CETIN, B.; ADIGUZEL, A.; SAHIN, F.; YETIM, H. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 428–435, 2012.

KIEVIT, T.; PARKINS, M.; GILLIS, R.; SRIKUMAR, R.; CERI, H.; POOLE, K.; IGLEWSKI, B.H.; STOREY, D. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1761–1770, 2001.

KIM, H.B.; PARK, C.H.; KIM, C.J.; KIM, E.-C.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 639–645, 2009.

KIRBIS, A.; KRIZMAN, M. Spread of Antibiotic Resistant Bacteria from Food of Animal Origin to Humans and Vice Versa. **Procedia Food Science**, v. 5, p.148-151, 2015.

KONGO, J. M. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments, Lactic Acid Bacteria. **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-starter-cultures-for-cheese-processing-past-present-and-future-developments>. Acesso em: 28 Mar. 2017

KUMAR, A.; SCHWEIZE, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, July 2005.

KÜREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **J. Dairy Sci.**, v. 99, p. 2675–2679, 2016.

LACHMAYR, K. L.; KERKHOF, L. J.; DIRIENZO, A. G.; CAVANAUGH, C. M.; FORD, T. E. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (*bla*TEM) genes in a wastewater stream. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 203-211, 2009.

LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4–22, 2012.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K.; WERTHEIM, H. F.; SUMPRADIT, N.; Vlieghe, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA,

Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEKSHMI, M.; AMMINI, P.; KUMAR, S.; VARELA, M. F. The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, p. 11, 2017.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

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.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063–1067, 2001.  
LUIZ, L. M. P.; CASTRO, R. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; NUNES, A.C.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, p. 125–128, 2016.

MACHADO, E.; CANTON, R.; BAQUERO, F.; GALÁN, J-C.; ROLLÁN, A.; PEIXE, L.; COQUE, T.M. Integron content of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 1823–1829, 2005.

MAGENIS, R. B.; PRUDENCIO, E. S.; MOLOGNONI, L.; DAGUER, H. A control method to inspect the compositional authenticity of minas frescal cheese by gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8333–8339, 2014.

MANGIA, N. P.; FANCELLO, F.; DEIANA, P. Microbiological characterization using combined culture dependent and independent approaches of Casizolu pasta filata cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 2, p. 329–345, 2016.

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.

MARTINEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 116–123, 2015.

MARTINS, S. C. S. G.; ROCHA JR, V. R.; CALDEIRA, L. A.; REIS, S. T.; BARROS, I. C.; OLIVEIRA, J. A.; SANTOS, J. F.; SILVA, G. W. V. Rendimento, composição e análise sensorial do queijo minas frescal fabricado com leite de vacas mestiças alimentadas com diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 4, p. 993–1003, 2012.

MATHEW, A. G.; CISSELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne pathogens and disease**, v. 4, n. 2, p. 115–33, 2007.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281–295, 2005.

MAYRHOFER, S.; FILIPP, R.; LEHNER, D.; REITERICH, C.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. Suitability of Different PCR-DGGE Primer Sets for the Monitoring of Lactic Acid Bacteria in Wine. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 35, n. 2, 2014

MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; ALEGRÍA, A.; LEITE, A. M. O.; PEIXOTO, R. S.; DELGADO, S. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. **Current Genomics**, v. 15, n. 4, p. 293–309, 2014.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 608–620, 2006.

MCGANN, P.; SNESRUD, E.; MAYBANK, R.; COREY, B.; ONG, A. C.; CLIFFORD, R.; HINKLE, M.; WHITMAN, T.; LESH, E.; SCHAECHER, K. E. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*<sub>CTX-M</sub> on a Novel IncF Plasmid: First report of *mcr-1* in the USA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4420–4421, jul 2016.

MEDVEĐOVÁ, A.; STUDENIČOVÁ, A.; VALÍK, L.; LADISLAV, O. Microbial and sensory quality of raw milk cheeses from the milk vending machines. **Acta Chimica Slovaca**, v. 6, n. 1, p. 49–54, 2013.

MENEZES, M. F.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota E Conservação Do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 76–89, 2014.

MICHAEL, C. A.; GILLINGS, M. R.; HOLMES, A. J.; HUGHES, L.; ANDREW, N. R.; HOLLEY, M. P.; STOKES, H. W.; Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. **The American Naturalist**, v. 164, n. 1, p. 1–12, 2004.

MINAS GERAIS. Governo do Estado de Minas Gerais. Lei nº 20549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Revoga a Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Diário do Executivo – 19 de dez. de 2012. Pag. 1, Col. 2. Belo Horizonte, 2012.

MIYAMOTO, M.; SETO, Y.; NAKAJIMA, H.; BURENJARGAL, S.; GOMBOJAV, A.; DEMBEREL, S.; MIYAMOTO, T. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Mongolian Fermented Milk. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 16, n. 4, p. 319 – 326, 2010.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 98–106, 2007.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, 2012.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465–470, 2005.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of dairy science**, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016.

NAKANO, V.; DO NASCIMENTO E SILVA, A.; MERINO, V.R.C.; WEXLER, H.M.; AVILA-CAMPOS, M.J. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. **Clinics**, v. 66, p. 543–547, 2011.

NDOYE, B.; RASOLOFO, E. A.; LAPOINTE, G. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 5, p. 495–524, 2011.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 409–420, 2011.

NG, L.K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol. Cell. Probes**, v. 15, p. 209–215, 2001.

NUNES, R. S. C.; SOUZA, C. P.; PEREIRA, K. S.; AGUILA, E. M. D.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 1–13, apr 2016.

ODEH, R.; KELKAR, S.; HUJER, A.M.; BONOMO, R.A.; SCHRECKENBERGER, P.C.; QUINN, J.P.; Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases



in clinical isolates of *Escherichia coli*. **Clin. Infec. Dis.**, v. 35, p. 140–145, 2002.

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 75–88, 2015.

PARENTE, E.; COCOLIN, L.; FILIPPIS, F.; ZOTTA, T.; FERROCINO, I.; O’SULLIVAN, O.; NEVIANI, E.; ANGELIS, M.; COTTER, P. D.; ERCOLINI, D. FoodMicrobionet: A database for the visualisation and exploration of food bacterial communities based on network analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 219, p. 28–37, feb 2016.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 64, p. 19-25, 2009.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286–5298, 2015.

PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; XAVIER MALCATA, F. Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 5, p. 213–219, 2009.

PEREIRA, M. M. G.; LIMA, M. T.; SANTANA, M. F. S. Queijo Minas Frescal. Comunicado Técnico, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. n. 12, p. 1-4, Abril, 2006.

PERIN, L. M.; BELLO, B. D.; BELVISO, S.; ZEPPA, G.; CARVALHO, A. F.; COCOLIN, F.; NERO, L. A. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 159–167, dec 2015.

PERIN, L. M.; SARDARO, M. L. S.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017.

PERRY, J. A.; WESTMAN, E. L.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: What’s new? **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 45–50, oct 2014.

PERRY, J. A.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistance “ mobilome ”: searching for the link between environment and clinic. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 86, 2012.

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. **Arquivos do instituto de Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191–198, 2011.

PLANÝ, M.; KUČHTA, D.; ŠOLTÝS, K.; SZEMES, T.; PANGALLO, D.; SIEKEL, P. Metagenomic analysis of Slovak Bryndza cheese using next-generation 16S rDNA amplicon sequencing. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 1, p. 23–34, 2016.

PEIXOTO, J. P. N.; NASCIMENTO, J. W. B.; FURTADO, D. A.; OLIVEIRA, C. J. B.; GOMES, J. P. Qualidade do ambiente e níveis de contaminação por micro organismos em queijarias, no agreste paraibano. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 2, p. 177–183, 2012.

PHUONG HOA, P. T.; NONAKA, L.; HUNG VIET, P.; SUZUKI, S. Detection of the sul1, sul2, and sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 405, p. 377–384, 2008.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629–636, 2006

POONSUK, K.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANHUEN, R. Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* non-cystic fibrosis clinical isolates. **Can. J. Microbiology**, v. 60, p. 437–443, 2014.

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, J. P. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1121–1123, 2010.

RANDAZZO, C. L.; TORRIANI, A.; AKKERMANS, A. D. J.; VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1882–1892, 2002.

RAVI, A.; AVERSHINA, E.; LUDVIGSEN, J.; L'ABÉE-LUND, T. M.; RUDI, K. Integrons in the Intestinal Microbiota as Reservoirs for Transmission of Antibiotic Resistance Genes. **Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 238–248, 2014.

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

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 19–23, 2009.

RIBEIRO V. B.; LINCOPAN N.; LANDGRAF M.; FRANCO B. D.G.M.; DESTRO M. T. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 685-692, 2011.

ROCHA, B. B.; SILVA, M. R.; SOUZA, G. N.; MOREIRA, M. A. S.; FARIA, L. S. Prevalência e fatores associados ao consumo de queijo não pasteurizado entre pacientes com tuberculose de uma área urbana do Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 21, n. 2, p. 96–100, 2014.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; CANO, M. E.; VELASCO, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, Á. Plasmid-mediated 473 quinolone resistance: An update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, p. 149–182, 2011.

SAHU, M.; BALA, S. Food Processing, Food Spoilage and their Prevention: An Overview. **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 753–759, 2017.

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

SANTOS, T. F.; SANTANA, L. K. A.; SANTOS, A. C. F.; SILVA, G. S.; ROMANO, C. C.; DIAS, J. C. T.; REZENDE, R. P. Lactic acid bacteria dynamics during spontaneous fermentation of cocoa beans verified by culture-independent denaturing gradient gel electrophoresis. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2702-2709, 2011.

SARKAR, S. Microbiological considerations: Pasteurized milk. **International Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 5, p. 206–218, 2015.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691–697, 2010.

SHAIKH, S.; FÁTIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015.

SHARAF, O. M.; IBRAHIM, G. A.; TAWFEK, N. F.; EFFAT, B. A. M.; SHAFEI, W. E.; EL-DIN, H. M. F.; SALEM, M. M. A. Prevalence of some pathogenic microorganisms in factories Domiati, Feta cheeses and UHT milk in relation to public health sold under market conditions in Cairo. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 5, p. 2807–2814, 2014.

SILVA, F. R.; SANTANA, C. M.; MELO, W. F.; TALABERA, G. G.; SARMENTO, W. E.; SOBRINHO, W. S.; SÁ, J. A.; MACHADO, A. V. Conservação e controle de qualidade de queijos : Revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 4, p. 333–341, 2017.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed., São Paulo: Varela, 2014.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 155–160, 2000.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; PRIBUL, B. R.; OLIVA, M. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative Staphylococcus isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 692–696, 2012.

SOHIER, D.; PAVAN, S.; RIOU, A.; COMBRISSE, S.; POSTOLLEC, S. Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 16, p. 1–10, 2014.

SÓKI, J.; FODOR, E.; HECHT, D.W.; EDWARDS, R.; ROTIMI, V.O.; KERÉKES, I.; URBÁN, E.; NAGY, E. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 413–419, 2004.

SOUZA, F. M.; NOGUEIRA, M. S.; NUNES, C. Qualidade Microbiológica Do Leite Cru Comercializado Informalmente Na Cidade De Areia-Pb. **Agropecuária Técnica**, v. 32, n. 1, p. 168–171, 2011.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53–57, 2012.

SPENGLER, G.; KINCSES, A.; GAJDÁCS, M.; AMARAL, L. New Roads Leading to Old Destinations : Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, 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.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014.

SUNDE, M.; THARALDSEN, H.; SLETTEMEÅS, J. S.; NORSTRÖM, M.; CARATTOLI, A.; BJORLAND, J. *Escherichia coli* of animal origin in Norway contains a *bla*TEM-20-carrying plasmid closely related to *bla*TEM-20 and *bla*TEM-52 plasmids from other European countries. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 215-216, 2009.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 2562–2566, 1996.

TAN, S. L.; LEE, H. Y.; MAHYUDIN, N. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. **Food Control**, v. 44, p. 203–207, 2014.

TEKINER, I. H.; ÖZPINAR, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing enterobacteriaceae from foods of animal origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 444–451, 2016.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 348-359, 2004.

THOMAS, T.; GILBERT, J. E MEYER, F. Metagenômica - um guia de amostragem para análise de dados. **Informática Microbiana e Experimentação**, v. 2, n. 3, 2012.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 763–70, 2000.

UEDA, O.; WEXLER, H. M.; HIRAI, K.; SHIBATA, Y.; YOSHIMURA, F.; FUJIMURA, S. Sixteen Homologs of the Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump in *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2807–2815, 2005.

VAN DENDER, A.G.F.; SCHNEIDER, I.S. Fabricação de “Queijo Branco” visando ao melhor aproveitamento do leite ácido. 2007. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_2/QueijoBranco/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/QueijoBranco/index.htm)>. Acesso em: 05/06/2017.

VERRAES, C.; BOXSTAEL, S. V.; MEERVENNE, E. V.; COILLIE, E. V.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; SCHAETZEN, M. A.; HUFFEL, X. V.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K.; DAUBE, G.; SAEGERMAN, C.; BLOCK, J. D.; DEWULF, J.; HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2643–2669, 2013.

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

XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.; GALES, A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 217, 2010.

WALSH, F. Investigating antibiotic resistance in non-clinical environments. **Frontiers**

in **Microbiology**, v. 4, n. 19, p. 1–5, 2013.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578–2585, 2001.

WILLMANN, M.; PETER, S. Translational metagenomics and the human resistome: confronting the menace of the new millennium. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 1, p. 41–51, 2017.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.B.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, p. 351–353, 2006.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 779–788, 2010.

YADAV, J.; PAUL, S.; PETER, J. K.; KUMATR, Y.; KUMAR, A.; MASIH, F.; MASHI, H. Comparative evaluation of pathogenic bacterial incidence in raw and pasteurized milk. **International Journal of Engineering Science Invention**, v. 3, n. 5, p. 11–20, 2014.

YONEDA, K.; CHIKUMI, H.; MURATA, T.; GOTOH, N.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, H.; NISHINO, T.; SHIMIZU, E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 243, p. 125–131, 2005.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. 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.

ZHU, L.; XU, H.; ZHANG, Y.; FU, G.; WU, P. Q.; LI, Y. BOX-PCR and PCR-DGGE analysis for bacterial diversity of a naturally fermented functional food (Enzyme). **Food Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 115–122, 2014.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; BEN ABDALLAH, F.; BEN KAHLA-NAKBI, A.; BEN HASSEN, A.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. **Folia Microbiol.**, v. 53, p. 357–362, 2008.



*Communication*

# Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer

Ana Caroline L. de Paula, Julliane D. Medeiros, Analice C. de Azevedo, Jéssica M. de Assis Chagas, Vânia L. da Silva and Cláudio G. Diniz \*

Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036–900 Juiz de Fora, MG, Brazil; carol.lopesdp@gmail.com (A.C.L.P.); jdutramedeiros@gmail.com (J.D.M.); analiceazevedo@hotmail.com (A.C.A.); jessica.chagas@hotmail.com.br (J.M.A.C.); vania.silva@ufjf.edu.br (V.L.S.)

\* Correspondence: cgdiniz@gmail.com; Tel.: +55–32–99151–5555

Received: 29 December 2017; Accepted: 15 February 2018; Published: 19 February 2018

**Abstract:** Antibiotic resistance poses an important threat to global public health and has become a challenge to modern medicine. The occurrence of antibiotic-resistant bacteria in a broad range of foods has led to a growing concern about the impact that food may have as a reservoir of antibiotic resistance genes. Considering Minas Frescal Cheese (MFC)—a typical Brazilian white soft cheese—and its economic and cultural values, in this study, medically relevant antimicrobial-resistance genetic markers (AR genes) were screened, and the occurrence of integrons were evaluated in manufactured MFC using culture-independent approaches. Through a fingerprinting analysis, the tested MFCs were brand-clustered, indicating reproducibility along the production chain. A common core of resistance markers in all brands evaluated and related antimicrobials such as  $\beta$ -lactams, tetracyclines, quinolones, and sulfonamide was detected. Several other markers, including efflux pumps and aminoglycosides-resistance were distributed among brands. Class 1 and 2 integrons were observed, respectively, in 77% and 97% of the samples. The presence of AR genes is of special interest due to their clinical relevance. Taken together, the data may suggest that the production chain of MFC might contribute to the spread of putative drug-resistant bacteria, which could greatly impact human health. Furthermore, detection of class 1 and class 2 integrons in MFC has led to discussions about resistance gene spread in this traditional cheese, providing evidence of potential horizontal transfer of AR genes to human gut microbiota.

**Keywords:** antibiotic resistance; genetic markers; Minas Frescal Cheese; integron

## 1. Introduction

As long as antimicrobial-resistant bacteria are being detected worldwide, associated to activities other than health-care and including food chain production, the phenomena will continue to pose a major threat to humans, animals, and environmental health and will become the focus of scientific investigation [1]. For several decades, studies on the dissemination of antibiotic resistance have focused mainly on health-care facilities and clinically relevant bacterial species [2]. However, it has been well

documented that antimicrobials widely used in livestock have contributed to the spread of antibiotic resistant bacteria or antimicrobial resistance genes throughout the food production chain up to consumers and surrounding environments. In addition, it is accepted that foodstuff may play an important role in the phenomena since ready to eat food may be cross contaminated with antimicrobial resistant bacteria during processing, becoming an important reservoir and raising questions about its safety [2–5].

Antimicrobial resistance in foodborne pathogens involves direct risk for consumers' health, impairs successful antibiotic treatment of infections, and increases the number of hospitalizations [6]. In addition, commensal bacteria found in the food may act as reservoirs for resistant genes which may potentially be transferred to gut microbiota and putative pathogens through horizontal gene transfer [7–9].

Resistance-encoding genes can be located on chromosomes or on mobile genetic elements, such as plasmids, transposons, and integrons, making them available for horizontal gene transfer [10]. Integrons are genetic platforms that may integrate gene cassettes (which are promoterless genetic elements) mainly related to antimicrobial resistance; they contain promoter(s) allowing the expression of those inserted cassettes and may be spread and incorporated into transposons and plasmids [11,12].

Dairy products such as milk and cheese have been implicated as potential sources for transmission of antimicrobial-resistant bacteria, with a direct link between the animal microbiota and the human gastrointestinal tract [13]. Minas Frescal Cheese (MFC), a white soft fresh cheese, is one of the most consumed and produced cheeses in Brazil. Due to the low salt content and high moisture, the MFC is an appropriate environment for the growth of putative pathogens. In addition, their manufacture involves technological steps that require the use of equipment without efficient treatments to reduce the microbial load [14–16]. Although sanitary legislations consider only classical foodborne pathogens such as coagulase-positive *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes*, and coliforms as quality indicators, other drug-resistant putative bacteria (DRB) may occur, posing a health issue [17–19].

To date, despite MFC having already been associated with multidrug-resistant bacteria, and considering the major microbial groups related to human health, there are no data on the cheese resistome, or even the clinical resistome including the occurrence of integrons, which would potentially be associated with antimicrobial-resistance genetic marker (AR genes) transfer. Most of the studies evaluating the prevalence of AR genes in cheese samples are based on methodological approaches such as isolation and identification of the resistant bacteria, followed by a molecular analysis of their AR determinants [18,20–23]. In this regard, a holistic view of cheese-resistome based on culture-independent approaches would retrieve valuable information on its quality, as those drug-resistant associated genes may be harbored by classical pathogens and by putative bacteria (not considered in food sanitary legislations) [20,24].

To contribute to aspects of clinical resistome and microbiological safety of manufactured MFC, this study aimed to perform a screening of clinically relevant antimicrobial-resistance genetic markers and evaluate the occurrence of integrons by culture-independent techniques based on direct analysis of total DNA from cheese samples. In addition, the application of the repetitive extragenic palindromic sequences polymerase chain reaction (rep-PCR) fingerprinting technique to compare the microbial community profile of MFC samples and evaluate its reproducibility was also evaluated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Processing and DNA Extraction

Samples from 35 cheeses from seven different commercially manufactured, trademarked, Minas soft cheeses (A, B, C, D, E, F, and G) were purchased in retail stores in Juiz de Fora (Minas Gerais state, Brazil). To obtain Brazilian sanitary certification, cheeses are made from pasteurized bovine milk. Following acquisition, the samples were kept in an ice box and sent to the laboratory for immediate processing. Total DNA was extracted directly from 5 samples (same batch) of seven different cheese brands. Twenty-five-gram cheese portions were weighted and homogenized in 225 mL of 2% (*w/v*) sterile sodium citrate (pH 7.5), using a shaker at 250 rpm for 20 min. Aliquots (50 mL) were centrifuged



(14,000 × g, 10 min), and the supernatant containing the fat layer was discarded. The pellet obtained was resuspended in 10 mL of Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); pH 8) and then centrifuged at 14,000 × g for 10 min. This step (addition of wash TE buffer and centrifugation) was repeated twice, and the obtained pellet was resuspended in 200 µl TE buffer. DNA was extracted from the cell pellet using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol. DNA concentration was determined by fluorimetry using the Qubit™ 2.0 fluorimeter, with the Qubit dsDNA HS Assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). DNA integrity was assessed by 0.8% agarose gel electrophoresis. The resulting purified DNA was stored at -70 °C until use.

## 2.2. Repetitive Extragenic Palindromic Sequences Polymerase Chain Reaction

The rep-PCR analysis was performed using the total DNA extracted directly from the cheese samples. The PCR reactions were performed according to Gaber et al. [25], with modifications, using a single primer (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'). PCR final concentration contained 1× Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.8 µM of the primer, 20 ng of DNA, and ultrapure PCR water (Promega) was added to a final volume of 25 µL. The PCR conditions were: 5 min at 94 °C; 30 cycles of 1 min at 94 °C; 1 min at 50 °C; 2.5 min at 72 °C; and a final extension of 10 min at 72 °C. The PCR products were checked by electrophoresis in 2% (*w/v*) agarose gel for 2 h at a constant voltage of 100 V in 1× Tris/Acetate/EDTA buffer (TAE). A 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil) was used as a molecular-size marker. Gels were stained using ethidium bromide, and the images were visualized in ultraviolet light transilluminator (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK). Fingerprints were analyzed using BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The similarities between the profiles were calculated using the Jaccard coefficient, and the dendrograms were constructed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

## 2.3. Screening of Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons

A set of 40 resistance genetic markers of human clinical relevance (clinical resistome), including genetic markers related to efflux pumps and class 1, 2, and 3 integrons, were screened from the metagenomic DNA of the samples by conventional PCR, using specific primers and amplification conditions previously described (Supplementary Table S1). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis 1.5% (*w/v*) in 1× Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer. DNA bands were visualized after gel staining with ethidium bromide on ultraviolet light transilluminator. Amplicon sizes were estimated by a 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec). Negative controls were performed as reactions without template DNA. As a positive control, amplicons were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and the DNA fragments obtained were sequenced in an ABI Prism 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and were further blasted against the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The clustering based on the occurrence of antibiotic resistance markers was performed by a principal component analysis (PCA) using a PAST program (version 3.14).

## 3. Results

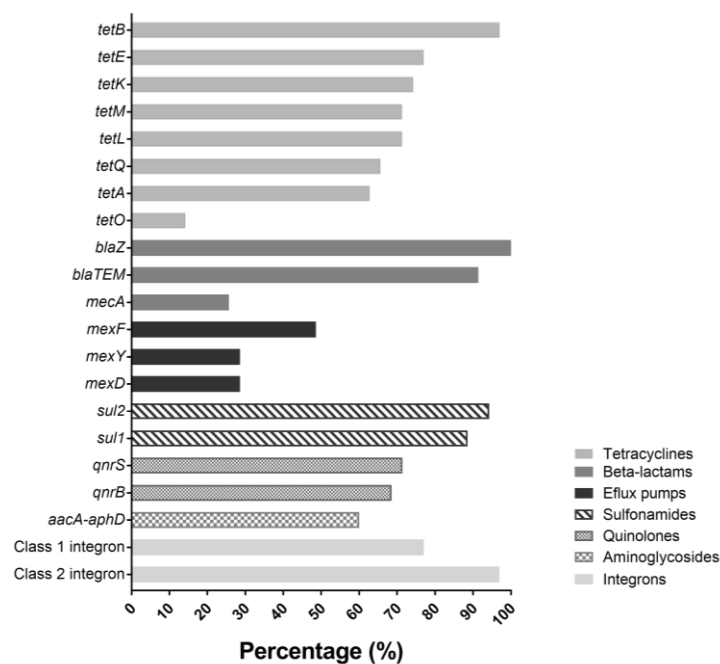
Repetitive extragenic palindromic sequences PCR was considered in this study as a culture-independent method, using the total DNA extracted from the cheese to compare the microbial community profile among samples from the same batch and to provide evidence of its reproducibility. The dendrogram obtained by rep-PCR clustering of cheese samples is presented in Figure 1. In general, considering a coefficient of similarity greater than 80%, the samples were clearly brand-clustered, suggesting standardization along the production chain and that the sampling in this study was reproducible. This result is in agreement with that expected since the products from the same batch are processed under similar conditions. However, one sample from brand E differed from the others, clustering with 55% similarity.



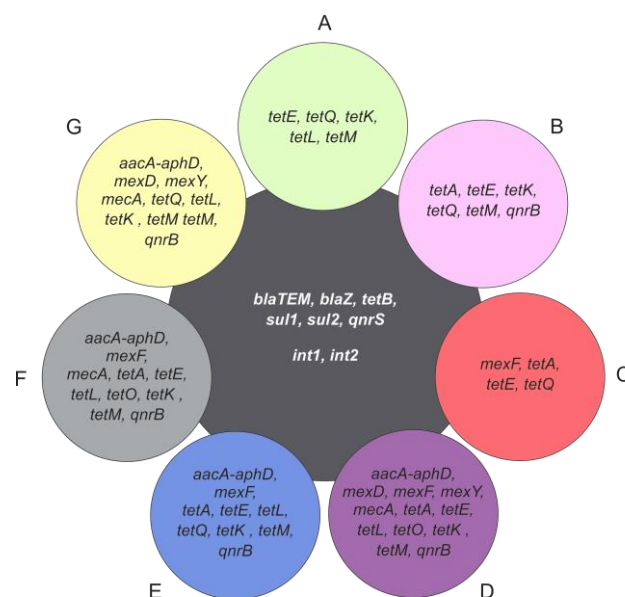
*blaZ*, *qnrS*, *sul1*, and *sul2*), were detectable in all brands (Figure 2b). In accordance with the clustering obtained by the rep-PCR fingerprint, the samples were also brand-clustered according to the occurrence profile of resistance markers, as observed in Figure 3.

PCR-based detection of integrons was carried out on all the samples, using specific primers for three different *intI* genes (*intI1*, *intI2* and *intI3*). Class 1 and 2 integrons were detected, respectively, in 77% and 97% of the samples and also characterized the common core of detectable genes in all brands (Figure 2b). Class 3 integrons were not detected in any sample analyzed.

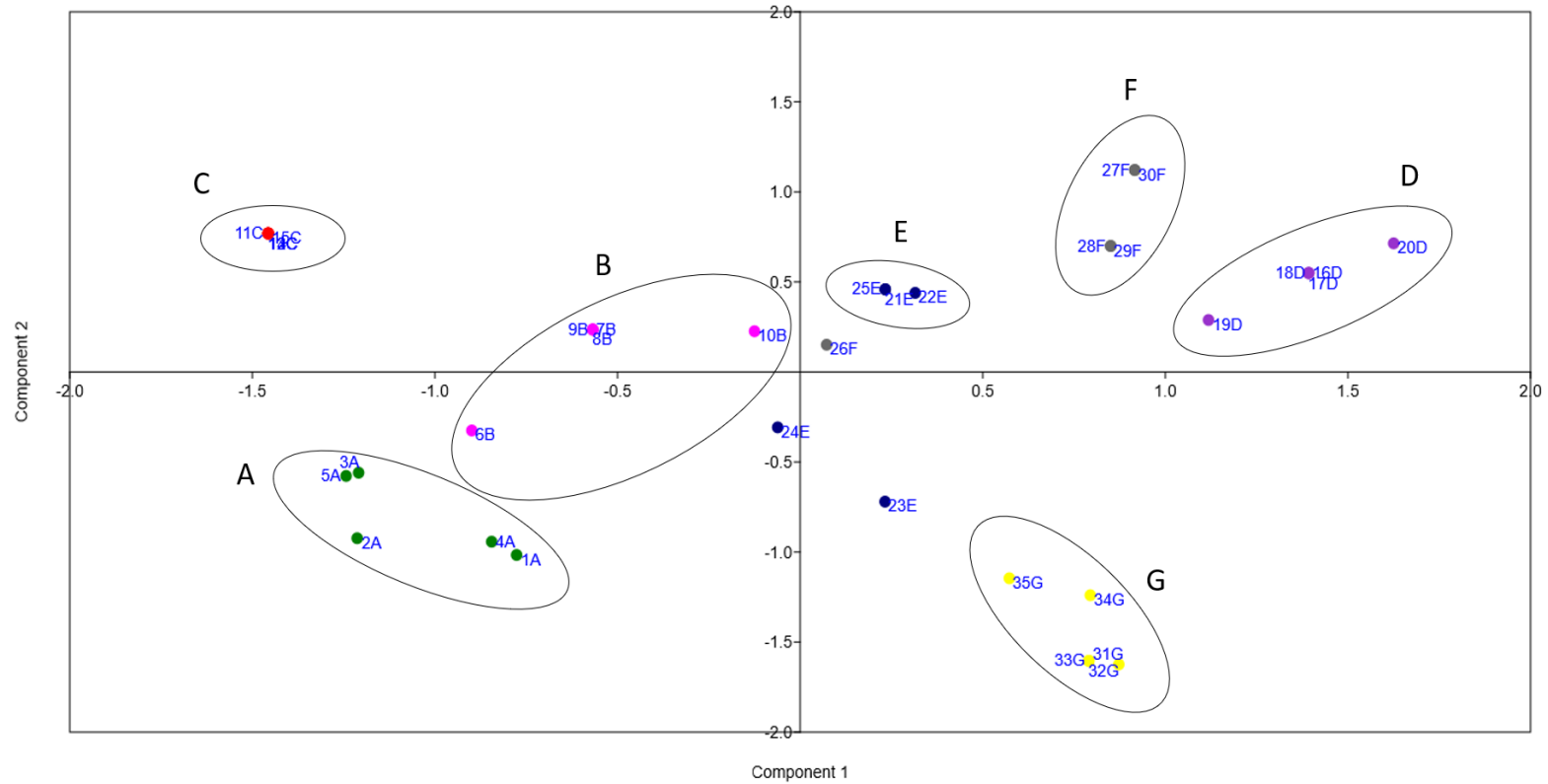
(a)



(b)



**Figure 2.** Clinical resistome composition of MFC. (a) Frequency of antimicrobial-resistance genetic markers detection based on their pharmacological properties; (b) Occurrence profile of antimicrobial-resistance markers among the cheese brands (A to G).



**Figure 3.** Clustering of cheese samples according to the occurrence of antibiotic resistance markers using principal component analysis (PCA). Green: brand A (1A to 5A); pink: brand B (6B to 10B); red: brand C (11C to 15C); purple: brand D (16D to 20D); blue: brand E (21E to 25E); grey: brand F (26F to 30F); yellow: brand G (31G to 35G).

#### 4. Discussion

In general, microbiota characterization, especially in food microbiology, using culture-dependent approaches may not reveal the overall microbial diversity due to its complexity. On the other hand, culture-independent methods based on molecular biology techniques, such as rep-PCR, have been suggested to globally characterize the microbial population and differentiate cheese samples [26,27].

In this study, a rep-PCR approach as a culture-independent method to compare the microbial community profile of MFC samples and evaluate its reproducibility in the same batches was employed. Of the tested samples, only one from brand E did not follow the 80% similarity criteria within the same batch. This sample clustered with a similarity of 55%, which may represent low quality control during manufacturing, addressing issues related to microbial contamination along food chain production. However, a limitation in this approach was the lack of the assessment of which groups of microorganisms are present or absent in each sample.

Antibiotic resistance genes are widely distributed in several different environments, including food production systems. Food microbiology has also taken advantage of culture-independent, DNA-based molecular methods for the detection and analysis of AR genes directly in food samples, including several cheese types. Devirgiliis et al. [28] investigated the presence of specific antibiotic resistance genes in total DNA extracted from the whole microbiome present in an Italian cheese using molecular approaches. PCR detection of tetracycline and erythromycin resistance genes was performed in DNA from commercial Spanish and Italian cheeses samples by Flórez et al. [20]. In this study, a specific white soft cheese as a model, that is, MFC, which is typically produced in Brazil and consumed fresh was chosen.

Several genetic markers related to antimicrobial resistance have been detected, namely, the *tet* genes, which are associated with ribosomal protection and tetracycline efflux mechanisms. These were the most prevalent among the processed MFC. Although tetracyclines are well-known for their broad spectrum of activity to Gram-positive and Gram-negative bacteria, the spread of tetracycline-resistant mechanisms limited their use in treating bacterial infections [29]. Worldwide use of tetracycline in livestock production is well-known and leads to the persistence of resistance in the food chain and facilitates its spread among human pathogens. The tetracycline resistance genes have been reported in lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from dairy products [28,30] including artisanal and industrial cheeses [20,31].

$\beta$ -lactams are also clinically relevant antibiotics, for which resistance genes have also been described in bacteria from several foods, including cheeses. The *mecA* gene related to methicillin resistance, detected in 25.7% of the cheese samples in this study, was previously associated with coagulase-negative *Staphylococci* in this kind of cheese [18]. Add to that, the *bla*<sub>TEM</sub>, related to extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), was detected in 91.4% of the samples. In general, ESBL is mainly encoded by mobile genetic elements such as integrons, transposons, and plasmids, which are easily transferable to other bacteria. Occurrence of *bla*<sub>TEM</sub> had already been documented in bacteria isolated from Portuguese soft and semi-soft cheeses [21]. Of especial interest, another  $\beta$ -lactams resistance gene, *bla*<sub>Z</sub>, was observed in all tested cheese sample. The data is impressive and may be related to the massive use of penicillin in Brazil, both in animal and human medicine. In cheese samples, *bla*<sub>Z</sub> has been reported in isolates of *Staphylococcus aureus* [32–34].

The presence of the aminoglycoside resistance gene (*aacA-aphD*) in 60% of the cheese samples is also of concern due to its controlled use, although this gene was already associated with coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cheese samples in Turkey [23]. Aminoglycosides are important drugs in human therapy and their use in animal husbandry has been strictly regulated to avoid the selection and spread of aminoglycoside-resistant bacteria [35].

Quinolone resistance genes, *qnrB* and *qnrS*, detected at rates of 68.6% and 71.4%, respectively, along with sulfonamide resistance genes, *sul1* and *sul2*, detected at rates of 88.6% and 94.3%, respectively, are also of particular interest; to date, these genetic markers have not been related to cheese. According to

the literature, both *qnr* and *sul* genes are thought to be integron- and plasmid- born genes and, thus, highly available to horizontal transfer and environmental persistence upon selective pressure [36–38].

Bacterial multidrug efflux pumps are antibiotic resistance determinants which may be found in all microorganisms. These transporters can actively extrude a variety of substrates such as antibiotics, heavy metals, dyes, detergents, organic solvents, among others, indicating their importance in bacterial physiology under environmental selective pressure as a defense mechanism. Unspecific efflux pumps that transport several compounds can be associated with bacterial cross-resistance, i.e., simultaneous resistance to different antimicrobial drugs and other xenobiotics [39,40]. Efflux pump genes detected in this study encode Mex-type multidrug resistance efflux pumps (*mexD*, *mexF*, and *mexY*). These Mex systems can export several drugs such as chloramphenicol, fluoroquinolones, and tetracycline and are often described in opportunistic pathogenic bacteria [41, 42].

Overall, the screening of AR genes in this study provided information on particularities of MFC processing. Although there is no available information with which to compare the results, taken together, the data may suggest that different manufacturing plants may face different contamination or even cross-contamination failures, leading to a peculiar AR profile in the final product which is available to the consumers. To date, it is not possible to address if the microbial contamination is related to the raw-material used in the dairy industry or related to human handling. However, the MFC resistome would be predictive of regional antimicrobial resistance epidemiology.

In Brazil, despite the lack of statistical information about the use of antibiotics in livestock, the  $\beta$ -lactams and tetracyclines are drugs frequently chosen for the treatment of infections affecting dairy herds [43]. In this study, several resistance-markers related to both treatment and prophylaxis in human and veterinary medicine were detected. According to the literature, food chain contamination including antimicrobial-resistant bacteria may be related to: (i) the use of xenobiotics in dairy, livestock, and agriculture, or (ii) contamination in plant processing or handling [5].

It is well-known that genes encoding antimicrobial resistance are often linked to mobile genetic elements. In this study, class 1 and 2 integrons were detected in 77% and 97% of the cheese samples, respectively, raising issues about AR gene mobilization. According to the literature, class 1, 2, and 3 integrons are historically associated with antimicrobial-resistance gene spread [44]. It has already been suggested that integrons might be associated with resistance to  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, quinolones, sulfonamides, macrolides, and tetracyclines [45–47].

Overall, the high prevalence of antibiotic resistance genes in MFC samples raises issues about its clinical resistome composition and the threat of the cheese ecosystem as a potential reservoir of resistance genes. In addition, the presence of class 1 and 2 integrons may lead to the risk of AR gene mobilization to human intestinal microbiota and putative pathogens. A larger scale investigation with metagenomic studies would clarify correlations between the bacterial community of MFC and the resistance markers detected in this study.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/2073-4425/9/2/106/s1](http://www.mdpi.com/2073-4425/9/2/106/s1), Table S1: Primers used in this study.

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge the Post-Graduate Program in Biological Sciences (PPGCBIO/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).

**Author Contributions:** C.G.D. and V.L.S. conceived and designed the experiments; A.C.L.P. and J.M.A.C. performed the experiments; A.C.L.P., J.D.M., and A.C.A. analyzed the data; A.C.L.P. wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Roca, I.; Akova, M.; Baquero, F.; Carlet, J.; Cavaleri, M.; Coenen, S.; Cohen, J.; Findlay, D.; Gyssens, I.; Heure, O.E.; et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* **2015**, *6*, 22–29, DOI: 10.1016/j.nmni.2015.02.007.
- Landers, T.F.; Cohen, B.; Wittum, T.E.; Larson, E.L. A Review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* **2012**, *127*, 4–22, DOI: 10.1177/003335491212700103.
- Founou, L.L.; Founou, R.C.; Essack, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–19, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01881.
- Bengtsson-Palme, J. Antibiotic resistance in the food supply chain: Where can sequencing and metagenomics aid risk assessment? *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *14*, 66–71, DOI: 10.1016/j.cofs.2017.01.010.
- Verraes, C.; van Boxtael, S.; van Meervenue, E.; van Coillie, E.; Butaye, P.; Catry, B.; Schaetzen, M.A.; van Huffel, X.; Imberechts, H.; Dierick, K.; et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *Int. J. of Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 2643–2669, DOI: 10.3390/ijerph10072643.
- Doyle, M.E. Multidrug-resistant pathogens in the food supply. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 261–279, DOI: 10.1089/fpd.2014.1865.
- Huddleston, J.R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect. Drug Resist.* **2014**, *7*, 167–176, DOI: 10.2147/IDR.S48820.
- Devirgiliis, C.; Barile, S.; Perozzi, G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes and Nutr.* **2011**, *6*, 275–284; DOI: 10.1007/s12263-011-0226-x.
- Rolain, J.M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 1–10; DOI: 10.3389/fmicb.2013.00173.
- Van Hoek, A.H.A.M.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A.P.; Aarts, H.J.M. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 1–27, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Gillings, M.R. Integrons: Past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78*, 257–277, DOI: 10.1128/MMBR.00056-13.
- Deng, Y.; Bao, X.; Ji, L.; Chen, L.; Liu, J.; Miao, J.; Chen, D.; Bian, H.; Li, Y.; Yu, G. Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2015**, *14*, 45, DOI: 10.1186/s12941-015-0100-6.
- Mathur, S.; Singh, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *105*, 281–295, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.
- Gomes, B.C.; Franco, B.D.G. de M.; De Martinis, E.C.P. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 197–205, DOI: 10.1089/fpd.2012.1222.
- Carvalho, J.D.G.; Viotto, W.H.; Kuaye, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control* **2007**, *18*, 262–267, DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.10.005.
- Brito, J.R.F.; Santos, E.M.P.; Arcuri, E.F.; Lange, C.C.; Brito, M.A.V.P.; Souza, G.N., Cerqueira, M.M.P.O.; Beltran, J.M.S.; Call, J.E.; Liu, Y.; et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4954–4961, DOI: 10.1128/AEM.01828-07.
- Visotto, R.G.; Oliveira, M.A.; Prado, S.O.T.; Bergamini, A.M.M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2011**, *70*, 8–15.
- Fontes, C.O.; Silva, V.L.; de Paiva, M.R.B.; Garcia, R.A.; Resende, J.A.; Ferreira-Machado, A.B.; Diniz, C.G. Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA*-encoding coagulase-negative Staphylococci isolated from soft cheese in Brazil. *J. Food Sci.* **2013**, *78*, 594–599, DOI: 10.1111/1750-3841.12088.
- Nunes, C.S.R.; Souza, C.P.; Pereira, K.S.; Del Aguila, E.M.; Paschoalin, V.M.F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 2641–2653.
- Belén Flórez, A.; Alegría, Á.; Rossi, F.; Delgado, S.; Felis, G.E.; Torriani, S.; Mayo, B. Molecular identification and quantification of tetracycline and erythromycin resistance genes in Spanish and Italian retail cheeses. *Biomed Res. Int.* **2014**, DOI: 10.1155/2014/746859.
- Amador, P.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Brito, L. Resistance to  $\beta$ -lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 1538–1551, DOI: 10.3390/ijms10041538.

22. Furlaneto-Maia, L.; Rocha, K.R.; Henrique, F.C.; Giazzi, A.; Furlaneto, M.C. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft cheese in Southern Brazil. *Adv. Microbiol.* **2014**, *4*, 175–181, DOI: 10.4236/aim.2014.43023.
23. Kürekci, C. *Short communication*: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 2675–2679, DOI: 10.3168/jds.2015-10725.
24. Perry, J.A.; Wright, G.D. The antibiotic resistance “mobilome”: Searching for the link between environment and clinic. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 138, DOI: 10.3389/fmicb.2013.00138.
25. Gaber, A.; Hassan, M.M.; Dessoky, E-D.S.; Attia, A.O. In vitro antimicrobial comparison of Taif and Egyptian Pomegranate Peels and seeds extracts. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **2015**, *3*, 12–17, DOI: 10.7324/JABB.2015.3203.
26. Perin, L.M.; Sardaro, M.L. S; Nero, L.A.; Neviani, E.; Gatti, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiol.* **2017**, *65*, 160–169, DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.005.
27. Perin, L.M.; Bello, B.D.; Belviso, S.; Zeppa, G.; Carvalho, A.F.; Cocolin, F.; Nero, L.A. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *214*, 159–167, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006.
28. Devirgiliis, C.; Caravelli, A.; Coppola, D.; Barile, S.; Perozzi, G. Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *128*, 378–384, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.021.
29. Grossman, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, DOI: 10.1101/cshperspect.a025387.
30. Huys, G.; D’Haene, K.; Collard, J.-M.; Swings, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1555–141032, DOI:10.1128/AEM.70.3.1555.
31. Devirgiliis, C.; Zinno, P.; Stirpe, M.; Barile, S.; Perozzi, G. Functional screening of antibiotic resistance genes from a representative metagenomic library of food fermenting microbiota. *Biomed Res. Int.* **2014**, *1–9*, DOI: 10.1155/2014/290967.
32. Carfora, V.; Caprioli, A.; Marri, N.; Sagrafoli, D.; Boselli, C.; Giacinti, G.; Giangolini, G.; Sorbara, L.; Dottarelli, S.; Battisti, A.; et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int. Dairy J.* **2015**, *42*, 12–15, DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.10.009.
33. Jamali, H.; Paydar, M.; Radmehr, B.; Ismail, S.; Dadrasnia, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control* **2006**, *54*, 383–388, DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.02.013.
34. Spanu, V.; Spanu, C.; Viridis, 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.* **2012**, *153*, 53–57, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.015.
35. Jaimee, G.; Halami, P.M. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin—An impending menace. *App. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1137–1151, DOI: 10.1007/s00253-015-7184-y.
36. Rodríguez-Martínez, J.M.; Cano, M.E.; Velasco, C.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, Á. Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *J. Infect. Chemother.* **2011**, *17*, 149–182, DOI: 10.1007/s10156-010-0120-2.
37. Phuong Hoa, P.T.; Nonaka, L.; Hung Viet, P.; Suzuki, S. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Sci. Total Environ.* **2008**, *405*, 377–384, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.023.
38. Sköld, O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* **2000**, *3*, 155–160., DOI: 10.1054/drup.2000.0146.
39. Piddock, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps—Not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 629–636, DOI: 10.1038/nrmicro1464.
40. Blanco, P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.A.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, A.; Sanchez, M.B.; Martinez, J.L. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **2016**, *4*, DOI: 10.3390/microorganisms4010014.



41. Kievit, T.; Parkins, M.; Gillis, R.; Srikumar, R.; Ceri, H.; Poole, K.; Iglewski, B.H.; Storey, D. Multidrug efflux pumps: Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1761–1770, DOI: 10.1128/AAC.45.6.1761.
42. Ueda, O.; Wexler, H.M.; Hirai, K.; Shibata, Y.; Yoshimura, F.; Fujimura, S. Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2807–2815, DOI: 10.1128/AAC.49.7.2807–2815.2005.
43. Galvani, J.W.C.; Tondo, E.C.; Brandelli, A. Commonly screened antibiotics in raw milk from dairy plants under State Inspection in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* **2017**, *57*, 147–15, DOI: 10.11606/issn.1678–4456.bjvras.2017.118547.
44. Cambray, G.; Guerout, A.-M.; Mazel, D. Integrons. *Ann. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 141–166, DOI: 10.1146/annurev-genet-102209–163504.
45. Mazel, D. Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 608–620, DOI: 10.1038/nrmicro1462.
46. Partridge, S.R.; Tsafnat, G.; Coiera, E.; Iredell, J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 757–784, DOI: 10.1111/j.1574–6976.2009.00175.x.
47. Ahmed, A.M.; Shimamoto, T.; Shimamoto, T. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *189*, 39–44, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.031.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Supplementary Material: Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer

Ana Caroline L. de Paula, Julliane D. Medeiros, Analice C. de Azevedo, Jéssica M. de Assis Chagas, Vânia L. da Silva and Cláudio G. Diniz \*

Table S1. Primers used in this study.

Target Gene	Class of antibiotic/ integron	Primer Sequence (5' – 3')	Amplicon (bp)	Reference
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	β-lactam	ATG TGC AGY ACC AGT AAA G GGT CAC CAG AAG GAG C	562	[1]
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	β-lactam	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	892	[1]
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	β-lactam	CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC	982	[1]
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	β-lactam	GTG CGC GGA ACC CCT ATT TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	968	[1]
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	β-lactam	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	[2]
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	β-lactam	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	[2]
<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	β-lactam	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	[2]
<i>bla<sub>OXA-143</sub></i>	β-lactam	TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC	149	[3]
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	β-lactam	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	[2]
<i>bla<sub>Z</sub></i>	β-lactam	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	[4]
<i>cfxA/cfxA2</i>	β-lactam	CGT AGT TTT GAG TAT AGC TTT GAT GTT GCC TAT ATA TGT C	802	[5]
<i>ampC</i>	β-lactam	ATA ACC ACC CAG TCA CGC CAG TAG CGA GAC TGC GCA	630	[6]
<i>bla<sub>SPM-1</sub></i>	β-lactam	CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	649	[7]
<i>cfiA</i>	β-lactam	TCC ATG CTT TTC CCT GTC GCA GTT AT GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC	683	[13]
<i>tet(A)</i>	Tetracycline	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	210	[9]
<i>tet(B)</i>	Tetracycline	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	659	[9]
<i>tet(E)</i>	Tetracycline	AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG	278	[9]
<i>tet(K)</i>	Tetracycline	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	360	[10]

<i>tet(L)</i>	Tetracycline	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	267	[9]
<i>tet(M)</i>	Tetracycline	AGT GGA GCG ATT ACA GAA CAT ATG TCC TGG GGT GTC TA	158	[10]
<i>tet(O)</i>	Tetracycline	AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC CGG CGG GGT TGG CAA ATA	1723	[11]
<i>tet(Q)</i>	Tetracycline	TTA TAC TTC CTC CGG CAT CG ATC GGT TCG AGA ATG TCC AC	904	[9]
<i>mrsA</i>	Methicillin	TCC AAT CAT AGC ACA AAA TC AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT	163	[12]
<i>mecA</i>	Methicillin	GTA GAA ATG ACT GAACGT CCGATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	[13]
<i>ereA</i>	Erythromycin	AAC ACC CTG AAC CCA AGG GAC G CTT CAC ATC CGG ATT CGC TCG A	420	[14]
<i>ereB</i>	Erythromycin	AGA AAT GGA GGT TCA TAC TTA CCA CAT ATA AAT CAT CAC CAC CAA TGG CA	546	[14]
<i>mphA</i>	Erythromycin	AAC TGT ACG CAC TTG C GGT ACT CTT CGT TAC C	837	[14]
<i>ermA</i>	MLS*	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	190	[10]
<i>ermB</i>	MLS*	CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATG AAA GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	142	[4]
<i>qnrB</i>	Quinolone	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG ATG AGC AAC GAT GCC TGG TA	476	[15]
<i>qnrS</i>	Quinolone	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	428	[15]
<i>sul1</i>	Sulfonamide	ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT CTG A CTA GGC ATG ATC TAA CCC TCG GTC T	815	[16]
<i>sul2</i>	Sulfonamide	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT	396	[17]
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglycosides	TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA	227	[10]
<i>Vgb</i>	MLS*	ACT AAC CAA GAT ACA GACGAGC TTA TTG CTT GTC AGC CTT CC	734	[18]
<i>cepA</i>	MLS*	TTT CTG CTA TGT CCT GCC C ATC TTT CAC GAA GAC GGC	743	[19]
<i>mexB</i>	Efflux pumps	GTG TTC GGC TCG CAG TAC TC AAC CGT CGG GAT TGA CCT TG	244	[20]
<i>mexD</i>	Efflux pumps	CGA GCG CTA TTC GCT GC GGC AGT TGC ACG TCG A	165	[21]
<i>mexF</i>	Efflux pumps	CGC CTG GTC ACC GAG GAA GAG T TAG TCC ATG GCT TGC GGG AAG C	255	[22]
<i>mexY</i>	Efflux pumps	CCG CTA CAA CGG CTA TCC CT AGC GGG ATC GAC CAG CTT TC	250	[20]
<i>IntI1</i>	Class 1 integron	GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	436	[23]
<i>IntI2</i>	Class 2 integron	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG TGTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	788	[23]
<i>Int3</i>	Class 3 integron	AGT GGG TGG CGA ATG AGT G TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG	600	[23]

\* Macrolide, Lincosamide, Streptogramin

## References

1. Jones, C.H.; Tuckman, M.; Keeney, D.; Ruzin, A.; Bradford, P.A.; Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 465–475, DOI: 10.1128/AAC.00883–08.
2. Woodford, N.; Ellington, M.J.; Coelho, J.M.; Turton, J.F.; Ward, M.E.; Brown, S.; Amyes, S.G.B.; Livermore, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 351–353.
3. Higgins, P.G.; Poirel, L.; Lehmann, M.; Nordmann, P.; Seifert, H.O. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 305–314, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014.
4. 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.* **2000**, *44*, 231–238, DOI: 10.1128/AAC.44.2.231–238.2000.
5. Giraud-Morin, C.; Madinier, I.; Fosse, T. Sequence analysis of *cfxA2*-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *51*, 1293–1296, DOI: 10.1093/jac/dkg221.
6. Odeh, R.; Kelkar, S.; Hujer, A.M.; Bonomo, R.A.; Schreckenberger, P.C.; Quinn, J.P.; Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 140–145, DOI: 10.1086/340742.
7. Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 699–702, DOI: 10.1093/jac/dkg416.
8. S $\acute{o}$ ki, J.; Fodor, E.; Hecht, D.W.; Edwards, R.; Rotimi, V.O.; Kerekes, I.; Urbán, E.; Nagy, E. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J. Med. Microbiol.* **2004**, *53*, 413–419, DOI: 10.1099/jmm.0.05452–0.
9. Ng, L.K.; Martin, I.; Alfa, M.; Mulvey, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* **2001**, *15*, 209–215, DOI: 10.1006/mcpr.2001.0363.
10. Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Werner, G.; Witte, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4089–4094, DOI: 10.1128/JCM.41.9.4089–4094.
11. Trzcinski, K.; Cooper, B.S.; Hryniewicz, W.; Dowson, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 763–770, DOI: 10.1093/jac/45.6.763.
12. Zmantar, T.; Chaieb, K.; Ben Abdallah, F.; Ben Kahla-Nakbi, A.; Ben Hassen, A.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. *Folia Microbiol.* **2008**, *53*, 357–362, DOI: 10.1007/s12223–008–0055–5.
13. Zhang, K.; Sparling, J.; Chow, B.L.; Elsayed, S.; Hussain, Z.; Church, D.L.; Gregson, D.B.; Louie, T.; Conly, J.M. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4947–4955, DOI: 10.1128/JCM.42.11.4947–4955.2004.
14. Sutcliffe, J.; Grebe, T.; Tait-Kamradt, A.; Wondrack, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2562–2566.
15. Kim, H.B.; Park, C.H.; Kim, C.J.; Kim, E.-C.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 639–645, DOI: 10.1128/AAC.01051–08.
16. Grape, M.; Sundström, L.; Kronvall, G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 1022–1024, DOI: 10.1093/jac/dkg473.
17. Hindi, A.K.; Shubbar, E.E.; Addos, S.A. Molecular study on distribution of *sul-1* and *sul-2* genes among *Salmonella enterica* causing enteric fever. *Mag. Al-Kufa Univ. Biol.* **2013**, *5*, 1–9.

18. 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.* **1999**, *43*, 1062–1066.
19. Nakano, V.; do Nascimento e Silva, A.; Merino, V.R.C.; Wexler, H.M.; Avila-Campos, M.J. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. *Clinics* **2011**, *66*, 543–547, DOI: 10.1590/S1807-59322011000400004.
20. Yoneda, K.; Chikumi, H.; Murata, T.; Gotoh, N.; Yamamoto, H.; Fujiwara, H.; Nishino, T.; Shimizu, E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *243*, 125–131, DOI: 10.1016/j.femsle.2004.11.048.
21. Xavier, D.E.; Picão, R.C.; Girardello, R.; Fehlberg, L.C.; Gales, A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 217, DOI: 10.1186/1471-2180-10-217.
22. El Amin, N.; Giske, C.G.; Jalal, S.; Keijser, B.; Kronvall, G.; Wretling, B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* **2005**, *113*, 187–196, DOI: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130306.x.
23. Machado, E.; Canton, R.; Baquero, F.; Galán, J.-C.; Rollán, A.; Peixe, L.; Coque, T.M. Integron content of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1823–1829, DOI: 10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005.