

**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  
2017**

**ANA CAROLINE LOPES DE PAULA**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**ORIENTAÇÃO**

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

**Juiz de Fora**

**2017**

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos  
Departamento de Biologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

## **COLABORAÇÃO**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Analice Cláudia de Azevedo

Dr<sup>a</sup>. Julliane Dutra Medeiros

M<sup>a</sup>. Thais Oliveira de Paula

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Barbosa Ferreira Machado

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## **APOIO FINANCEIRO**

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

## RESUMO

O queijo Minas Frescal representa um dos queijos mais consumidos no país. Diversos fatores influenciam suas características microbiológicas, e conseqüentemente, sua qualidade e propriedades. Seu alto teor de umidade e os riscos de contaminação durante a cadeia produtiva favorecem a ocorrência de microrganismos contaminantes, muitas vezes apresentando perfis de resistência aos antimicrobianos. Dessa forma, torna-se importante a investigação sobre a estrutura da comunidade bacteriana em queijo Minas Frescal, bem como a avaliação do perfil de marcadores genéticos microbianos de resistência a drogas e seu potencial de mobilização. Neste estudo foram obtidas 5 amostras de um mesmo lote de 7 marcas de queijos Minas Frescal identificadas de A a G, totalizando 35 amostras. Após a extração de DNA total das amostras, foram utilizadas abordagens de DNA *fingerprint*. A amplificação de sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (rep-PCR) foi utilizada para avaliação comparativa da similaridade da estrutura global da comunidade bacteriana. A técnica de PCR-DGGE foi utilizada para avaliar o perfil e a riqueza das amostras com relação a grupos de bactérias lácticas. As 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 em *clusters* diferentes de acordo com as suas respectivas marcas, sendo que as amostras de 5 marcas agruparam-se com 100% de similaridade, sugerindo reprodutibilidade ao longo da cadeia de produção. Além disso, perfis semelhantes entre amostras de marcas diferentes foram observados, indicando a presença de um núcleo microbiano comum. O estudo do perfil da comunidade bacteriana láctea utilizando PCR-DGGE revelou diferenças em grande parte das amostras. As amostras de mesma marca tenderam a se agrupar, porém em *clusters* separados. A marca E apresentou maior variável riqueza para o grupo de bactérias lácticas. Para a avaliação do resistoma clínico, a presença de marcadores de resistência a classe dos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e marcadores relacionados a bombas de efluxo de tipo Mex foi avaliada por reação de PCR. Dos 24 marcadores de resistência avaliados, 8 foram detectados, sendo 91,4% das amostras positivas para o gene *bla*<sub>TEM</sub>; 97,1% para o gene *CfiA*; 100% para o gene *bla*<sub>Z</sub>; 60% para o gene *aacA-aphD*; 48,6% para o gene *mexF*; 28,6% para o gene *mexD* e *mexY*; e 25,7% para o gene *mecA*. A freqüência de detecção de marcadores de resistência ao grupo dos beta-lactâmicos foi maior comparada aos outros grupos. Como perspectivas ainda serão feitas a avaliação da ocorrência de outros marcadores de resistência; investigação da ocorrência de integrons de classes 1, 2 e 3 como forma de avaliar a capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência; correlação entre a ocorrência de marcadores genéticos de resistência a drogas e estrutura da comunidade bacteriana; e análise estatística dos resultados.

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

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detecção de genes de resistência em isolados de produtos lácteos.....	26
Tabela 2. Sequência dos oligoiniciadores usados para amplificar fragmentos de genes DNAr 16S.....	35
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanhos dos fragmentos esperados e referências.....	38
Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados da variável riqueza para grupos de bactérias lácticas.....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal.....	17
Figura 2. Estrutura do Integron e mecanismo de captura de genes.....	23
Figura 3. Esquema do gene RNAr 16S.....	28
Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental.....	32
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.....	43
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.....	43
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.....	45
Figura 8. Porcentagem de ocorrência dos marcadores detectados.....	47
Figura 9. Ocorrência de marcadores genéticos entre as marcas de queijos.....	48
Figura 10. Agrupamento das amostras de queijo baseado na ocorrência dos marcadores genéticos de resistência, utilizando uma análise de componente principal (PCA).....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BAL- Bactérias do ácido láctico
- DGGE- Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- 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

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1 Queijo Minas Frescal .....	12
2.1.1 Microbiota do Queijo Minas Frescal.....	14
2.1.2. Fatores associados a contaminação do Queijo Minas Frescal .....	16
2.2 Fenômeno da resistência aos antimicrobianos .....	19
2.2.1 Aspectos gerais da antibioticoterapia .....	19
2.2.2 Resistoma .....	21
2.2.3 Integrons.....	22
2.2.4 Alimentos como potenciais reservatórios de genes de resistência .....	24
2.3 Abordagens contemporâneas para o estudo da microbiota de queijos.....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Delineamento Experimental .....	32
4.2 Processamento das amostras e extração do DNA.....	33
4.3 Análise da diversidade genética da comunidade dos queijos .....	34
4.3.1 DNA <i>fingerprint</i> com amplificação de sequência repetitiva extragênica palindrômica (rep-PCR) .....	34
4.3.2 Amplificação de DNAr 16S de representantes do grupo de bactérias lácticas utilizando oligoiniciadores específicos .....	35
4.3.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante .....	36
4.4 Detecção dos genes de resistência e integrons.....	37
<b>5. RESULTADOS</b> .....	42
5.1 Avaliação comparativa da similaridade da estrutura global da comunidade bacteriana por rep-PCR .....	42
5.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	44
5.3 Detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos.....	46
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60



## 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, através da 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 dos 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 torna-se 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 ou muitas vezes denominada mobilidade gênica está relacionada, nestes ecossistemas a elementos genéticos

móveis extracromossomais denominados de 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, de maneira contemporânea e 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; REGIS 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 consumo de queijos no Brasil ainda é pequeno quando comparado a outros países, como Argentina e países Europeus. Apesar disso, o mercado brasileiro de queijos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, impulsionado pelo aumento no poder aquisitivo e por suas características nutricionais e sensoriais. O consumo médio de queijos por habitante no Brasil aproxima-se de 5,1 quilos por ano e há uma projeção de que em 2030, o consumo seja em torno de 11 Kg por habitante (ABIQ, 2014; LEITE & DERIVADOS, 2015).

O queijo tipo Minas Frescal é considerado um dos mais populares, pois 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. 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, normalmente é produzido a partir do leite *in natura*, comercializado em feiras livres ou de forma autônoma, o que muitas vezes põe em risco a qualidade e segurança do alimento (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; CARDOSO e ARAÚJO, 2004; DORIGON, 2010). 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).

O sabor, as propriedades de textura, o aspecto visual e as características nutricionais dos queijos em geral são originados a partir da combinação de características bioquímicas, tecnológicas e microbiológicas (FONTES et al., 2013). A atividade dos microrganismos, de fato, produz transformações importantes na matriz dos queijos, afetando diretamente as propriedades e a qualidade do produto final. As características microbiológicas por sua vez são influenciadas pela matéria prima utilizada para a fabricação, forma de processamento, práticas de higiene durante fabricação, condições de armazenamento e tempo de maturação (BEMFEITO et al., 2016; REGIS et al., 2017).

Sabe-se que a fabricação dos queijos Minas está muito relacionada às características locais, regionais e nacionais (FOX e COGAN, 2004). Apesar de envolver etapas de produção semelhantes, a diversificação da metodologia para a sua

elaboração afeta diretamente suas características microbiológicas e, conseqüentemente, sua qualidade e propriedades (FRITZEN-FREIRE et al., 2010; MARTINS et al., 2012). Por isso, é bastante comum observar variações entre queijos Minas de origens, lotes de produção ou formas de processamento diferentes (RIBEIRO; SIMÕES e JURKIEWICZ, 2009; SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011; PERIN et al., 2017). 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. Nesse contexto, a avaliação e a caracterização do perfil microbiano é importante para o estudo da diversidade, identidade e para o controle de qualidade desse alimento (PEREIRA, GOMES e XAVIER MALCATA, 2009; DIAS et al., 2016).

### 2.1.1 Microbiota do Queijo Minas Frescal

#### *Bactérias Lácticas*

O leite é um meio nutricionalmente rico, onde muitos grupos microbianos, geralmente associados aos alimentos, podem ser encontrados. Dentre esses grupos, destacam-se as bactérias do ácido láctico (BAL), que normalmente são encontradas em concentrações significativas e estão naturalmente presentes no leite (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

A microbiota láctea desempenha um papel importante na elaboração de queijos. Os gêneros mais comumente encontrados são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010). 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, as 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).

Durante o processo de pasteurização, além da redução de microrganismos contaminantes prejudiciais à saúde, ocorre também uma redução na microbiota

natural do leite, eliminando parte das bactérias lácticas. Por isso, 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, 2009; NUNES et al., 2016). Os queijos Minas também podem ser fabricados apenas pela adição do agente coagulante, sem adição do fermento. Nesse caso, apesar de 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. Os queijos Minas Frescal podem ainda ser fabricados por acidificação direta do leite com ácido láctico antes da adição do coalho, sem a adição de fermento. Essas variações no processo de fabricação afetam diretamente a composição de bactérias lácticas na microbiota do queijo (BRASIL, 1997; RALL et al., 2010; FRITZEN-FREIRE et al., 2010).

### *Bactérias contaminantes*

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).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) divulga periodicamente a relação dos casos de DTA ocorridos no país. O último levantamento descreve o número de surtos entre 2007 e 2016. Entre os tipos de alimentos envolvidos nestes surtos, a categoria leite e derivados ocupa o 5º lugar, com 2,6% dos casos, sendo que em mais da metade dos casos (66,8%) não foi possível identificar o alimento envolvido (BRASIL, 2016).

Os produtos lácteos, principalmente queijos frescos, possuem condições propícias à proliferação de microrganismos, e, por isso, são considerados meios comuns de transmissão de patógenos (DAMACENO et al., 2015). Dentre os principais microrganismos contaminantes 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, 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 (UFC) 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 patógenos, que na maioria das vezes estão presentes acima dos valores permitidos (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 ou falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do produto.

Além disso, a legislação sanitária atual considera a presença de grupos microbianos específicos como indicadores de segurança e qualidade. Entretanto, outros grupos potencialmente patogênicos também podem ocorrer e sugerir contaminação na cadeia produtiva (JAY, 2000; ROCHA; SILVA e SOUZA, 2014). Fontes e colaboradores (2013) obtiveram 246 isolados de Queijos Minas Frescal industrializados, identificados presuntivamente como bactérias do gênero *Staphylococcus*. Deste total, 227 foram identificados como *Staphylococcus coagulase* negativo, considerado um grupo importante de bactérias patogênicas.

### **2.1.2. Fatores associados a contaminação do Queijo Minas Frescal**

Diante da preocupação crescente com a segurança dos alimentos, torna-se necessária a avaliação dos pontos críticos de produção, visando minimizar a contaminação dos produtos ofertados e monitorar a sua qualidade. A produção do Queijo Minas Frescal fabricado em indústrias de laticínio prevê a realização diversas etapas tecnológicas (Figura 1).



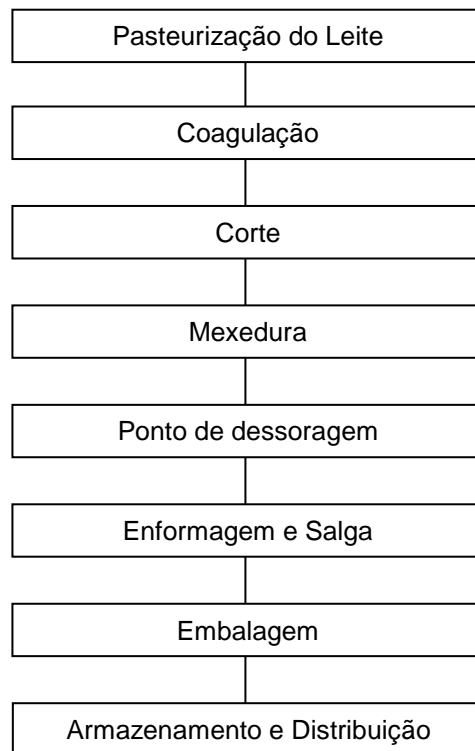


Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal

O leite é obtido e pasteurizado, passando por procedimentos necessários para coagular a caseína (proteína do leite) e dar origem à massa do queijo (coalhada). 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 retirada do soro (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, 2009).

A qualidade do queijo Minas Frescal é determinada principalmente pela qualidade da matéria prima (PINTO et al., 2011; MURPHY et al., 2016; REGIS et al., 2017). 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 necessários não sejam tomados (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 e tratamento térmico (SOUZA; NOGUEIRA e NUNES, 2011; MENEZES et al., 2014).

O queijo tipo 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 destruição 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).

O processamento do leite após o processo de pasteurização também constitui fator de risco para contaminações (MEDVEĎOVÁ et al., 2013). 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. Desta forma, a qualidade do queijo também está relacionada a um rigoroso controle das boas práticas de fabricação, higiene pessoal e saúde dos empregados, sanitização e manutenção correta dos equipamentos e do ambiente de trabalho (FERNANDES, ANDREATTA, e OLIVEIRA, 2006; SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012).

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).

Tendo em vista os potenciais riscos de contaminação na cadeia produtiva dos Queijos Minas Frescal e seu alto consumo em toda a população brasileira, torna-se relevante a análise e a caracterização microbiológica desses alimentos, como forma de avaliar o nível de qualidade do produto ofertado, bem como a qualidade empregada no processamento.

## **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. Os antibióticos foram tão bem sucedidos que foram consideradas as "drogas milagrosas". Como resultado do 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 possuem 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 poderiam em breve se assemelhar às aquelas como antes da descoberta dos antibióticos (FIELDS, LEE e MCCONNELL, 2016; SPENGLER e AMARAL, 2017). Relatos descrevem a identificação e disseminação de genes de resistência a antibióticos de último recurso, como a colistina (LIU et al., 2015; MCGANN et al., 2016).

O aumento do fenômeno de resistência pode ser associado a diversos fatores, incluindo o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, transmissão 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; CREAVER e BRADY, 2017).

### 2.2.2 Resistoma

No passado, o foco histórico da pesquisa em resistência aos antibióticos estava voltado para a resistência associada a patógenos clínicos, mas, em muitos casos, estes estudos fornecem pouca informação sobre as origens e fontes da resistência a antibióticos. Torna-se cada vez mais claro que o ambiente é uma vasta fonte de genes de resistência. O desenvolvimento de técnicas microbiológicas independentes de cultivo revelou novas abordagens para o conhecimento dos determinantes genéticos associados à resistência aos antibióticos (PERRY, WESTMAN e WRIGHT, 2014; DOYLE, 2015).

O microbioma abrange todas as células procarióticas na biosfera. Os fenótipos exibidos pelo microbioma global são codificados pelo pangenoma microbiano, ou seja, o conjunto de genes presentes em todos os genomas de todos os procariotas na biosfera. A porção do pangenoma que contém os genes de resistência destes microrganismos é chamada de resistoma. Portanto, o conceito de resistoma envolve a totalidade dos 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).

As bactérias podem apresentar genes que codificam resistência por diferentes mecanismos: produção de enzimas que degradam ou inativam os antibióticos; alteração na permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico; expressão de bombas de efluxo; alterações no sítio alvo do antibiótico (BLAIR et al., 2015; MUNITA e ARIAS, 2016). As beta-lactamases, enzimas que degradam o anel beta-lactâmico, são codificadas por genes geralmente chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em elementos genéticos móveis. Existem diversas variantes dessa enzima, codificadas por diferentes genes como *bla<sub>Z</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* (BABIC; HUJER e BONOMO,

2006; SHAIKH et al., 2015; TEKINER e OZPINAR, 2016). O gene *mecA* codifica alteração no sítio alvo através da produção de uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP2a), sendo o principal gene relacionado a resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* (SOARES et al., 2012). A expressão de genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY* codifica a presença de bombas de efluxo, que efetuam a expulsão de antimicrobianos do meio intracelular bacteriano para o meio extracelular (NEVES et al., 2011).

O estudo do resistoma é fundamental para a compreensão do papel dos diferentes ecossistemas como reservatórios desses 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).

Uma porção do pangenoma é capaz 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 (PERRY e WRIGHT, 2013).

### **2.2.3 Integrons**

Os integrons representam uma classe importante de elementos genéticos considerados sistemas de clonagem e expressão gênica, com a capacidade de integrar genes de resistência a diversos antimicrobianos 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. No entanto, também são frequentemente localizados em elementos genéticos móveis como transposons e plasmídeos, que poderiam servir como veículos para a transmissão de genes inter e intra-espécies (RAVI et al., 2014; GILLINGS, 2017).

A estrutura funcional de um integron (Figura 2) consiste em um gene (*intl*) 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 frames*) 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).

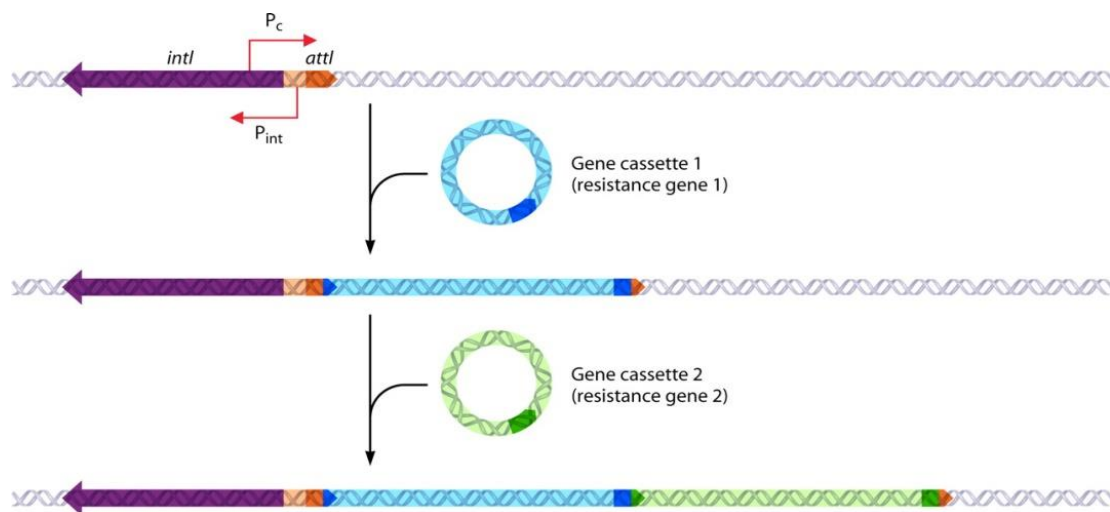


Figura 2. Estrutura do Integron e mecanismo de captura de genes  
Fonte: Davies, 2010

Esses cassetes gênicos são elementos móveis sem promotores que podem ser incorporados e excisados dos integrons. Uma vez que não possuem a 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 ( $P_c$ ) orientado para o ponto de integração (MICHAEL et al., 2004; MAZEL, 2006; PINTO, 2013). O promotor de integrase ( $P_{int}$ ) 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 a períodos de indução de estresse (CAMBRAY, GUEROUT e MAZEL, 2010; CAMBRAY et al., 2011).

O integron pode ser classificado em cinco classes, dependendo do gene codificador da integrase, sendo as classes 1 (*intl1*), 2 (*intl2*) e 3 (*intl3*) as mais relacionadas com genes de resistência (MAZEL, 2006; GILLINGS, 2014; RAVI et al., 2014). 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 (DENG et al., 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, CISELL 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 trabalhadores. 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 (FERREIRA et al., 2014; 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 digestivo 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).

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 isolados bacterianos por testes de susceptibilidade a antimicrobianos ou investigam a presença de genes de resistência em grupos de microrganismos isolados específicos, como mostrado na 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 propagação

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 avaliar questões relacionadas a fontes de contaminação.

Tabela 1 – Detecção de genes de resistência em isolados de produtos lácteos

Alimento	Isolado	Genes de Resistência Detectados	Referência
Produto de Leite fermentado	<i>E. faecalis</i>	tet (M), tet (L)	HUMMEL; HOLZAPFEL e FRANZ, 2007
Leite cru e queijo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>erm A, ermB, ermC, mec A, blaZ, aacA-aphD, mecA</i>	JAMALI et al, 2015
Leite	<i>Lactobacillus</i>	<i>ermB, tet(W), gyrA, vanX</i>	GUO et al., 2017
Queijo	<i>Echerichia coli</i>	<i>bla<sub>TEM</sub> tet(B), tet(A) bla<sub>CMY-2</sub></i>	RIBEIRO et al., 2016
Queijo	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	<i>mecA, blaZ, ermA, ermB, ermC, mrsA, mrsB, linA, aacA-aphD</i>	FONTES et al., 2013
Queijo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>blaZ</i>	SPANU et al., 2010
Queijo	Isolados pertencentes à família Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	AMADOR et al., 2009
Queijo, Yogurt, Leite, Nata	<i>Lactobacillus spp., Lactococcus spp., Streptococcus spp.</i>	<i>tet(M), 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 bolores. 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).

Embora esses métodos sejam sensíveis, algumas propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas, e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas (NDOYE et al., 2011; FUKUDA et al., 2016). A principal limitação das técnicas baseadas no cultivo é a existência de grupos microbianos que não são cultiváveis com as técnicas atualmente utilizadas. O isolamento em meio de cultivo exige que a composição do meio supra todas as necessidades dos microrganismos, porém, o repertório metabólico dos procariontes 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 16S RNAr, 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 procariontes; possuem regiões altamente conservadas, nas quais podem ser desenhados oligoiniciadores 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 16S DNAr disponíveis para comparação em bases de dados (DE FILIPPIS; PARENTE e ERCOLINI, 2016; FUKUDA et al., 2016).

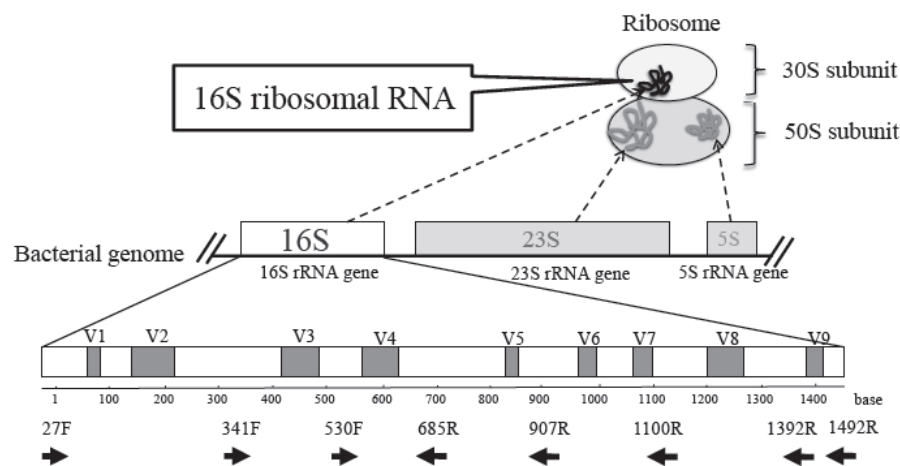


Figura 3: Esquema do gene RNAr 16S

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). 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, definida como a análise genética direta de genomas contidos em uma amostra ambiental (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 mais aprofundada. Por meio das técnicas de sequenciamento, pode-se 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 microbiana em queijos Minas Frescal industrializados visando correlacionar os riscos à saúde humana através da presença e do potencial de mobilização de marcadores de resistência a antimicrobianos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar e comparar o perfil da estrutura global da comunidade bacteriana das amostras de Queijo Minas através da amplificação de sequência repetitiva extragênica palindrômica (rep-PCR);
- Avaliar e comparar o perfil da microbiota láctea das amostras de Queijo Minas através da técnica de DGGE utilizando oligoiniciadores específicos para o grupo de bactérias lácticas;
- Avaliar a ocorrência de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas por reação de PCR convencional a partir DNA metagenômico obtidos das amostras;
- Avaliar a ocorrência de integrons classes 1, 2 e 3 por reação de PCR convencional.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

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

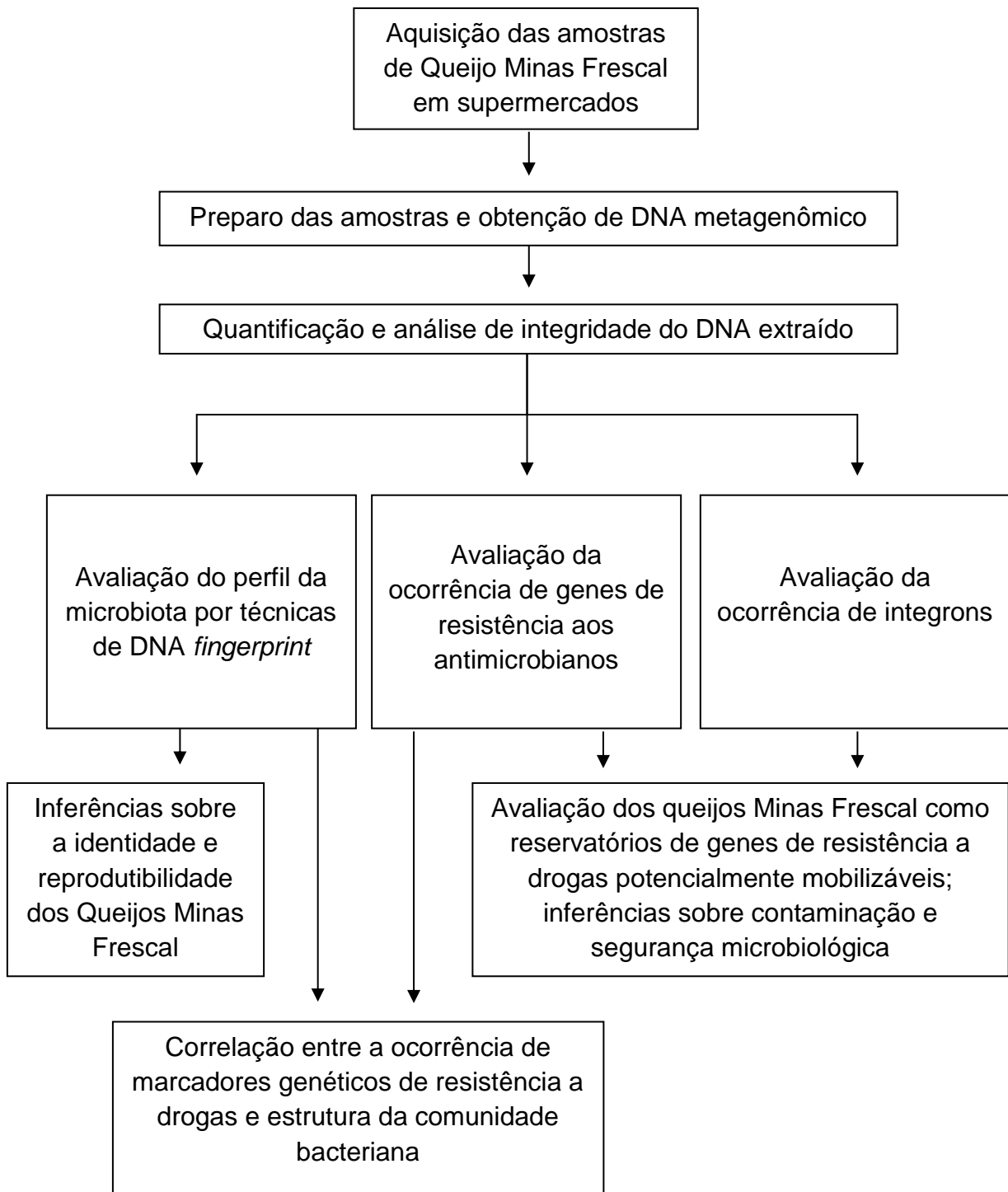


Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental



## 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 em supermercados 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, que foram realizadas em no 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 cada queijo, que foi posteriormente macerada em uma placa de Petri estéril com auxílio de uma espátula e solubilizada em 225 mL citrato de sódio 2% (w/v), sob agitação constante, por 30 minutos. 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 ressuspenso 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, o pellet obtido foi ressuspenso em 200 µL de TE e aliquoteado.

O DNA total foi extraído manualmente a partir do pellet ressuspenso em 200 µL de TE, usando o kit comercial *QIAamp™ DNA Stool Mini Kit*, de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações para aumento no rendimento do DNA metagenômico.

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 aliquoteado e armazenado em freezer a -70°C.

### 4. 3 Análise da diversidade genética da comunidade dos queijos

O perfil genético das populações bacterianas presentes nas amostras de queijos foi avaliado pela técnica de rep-PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante.

#### 4.3.1 DNA *fingerprint* com amplificação de sequência repetitiva extragênica palindrômica (rep-PCR)

As análises por rep-PCR foram feitas usando o DNA total extraído diretamente das amostras. As reações foram realizadas de acordo com Perin e colaboradores (2015), com algumas modificações, usando um único oligoiniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'). O volume das reações de PCR foram de 25 µL, contendo 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL de DNA (~20 ng/µL), 20 pMol de oligoiniciador e o volume completado com água.

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 dendograma foi construído com base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) para análise dos grupamentos.

### 4.3.2 Amplificação de DNAr 16S de representantes do grupo de bactérias lácticas utilizando oligoiniciadores específicos

Fragmentos do gene codificador do RNAr 16S de representantes do grupo de bactérias lácticas foram amplificados de acordo com ENDO e OKADA (2005), com algumas modificações. Os oligoiniciadores utilizados estão listados na tabela 2. O par de iniciadores Lac1 / Lac2GC é específico para os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc* e o par de iniciadores 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. Através de testes com diferentes combinações de oligoiniciadores, Endo e Okada (2005) observaram que o uso de todos os três iniciadores em uma única PCR foi útil para analisar a diversidade de BAL.

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

Primer	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- GCGCCCGGGCGGCC- GGGGCACCGGGGAT- 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  $\mu$ L, contendo 12,5  $\mu$ L de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 50 ng de DNA, 12,5 pMol de cada primer e o volume completado com água. 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 mL 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).

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

#### 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 oligoiniciadores específicos e condições de amplificação já descritas na literatura (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25  $\mu$ L, contendo 1 X Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ L de DNA (~20 ng/ $\mu$ L), o volume do oligoiniciador foi de acordo com a referência usada e o volume completado com água. As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Biometra T1 *Thermal Cycler*, Gttingen, Alemanha). Após eletroforese em gel de agarose 1,5%, os *amplicons* foram corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta (GE *Healthcare*, Reino Unido). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA *ladder* (Promega, Madison, WI, USA). As condições de amplificação, bem como as concentrações de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores seguiram os protocolos das referências.

O controle negativo 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

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, sugerindo um boa reprodutibilidade e homogeneidade da amostragem utilizada nesse estudo.

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.

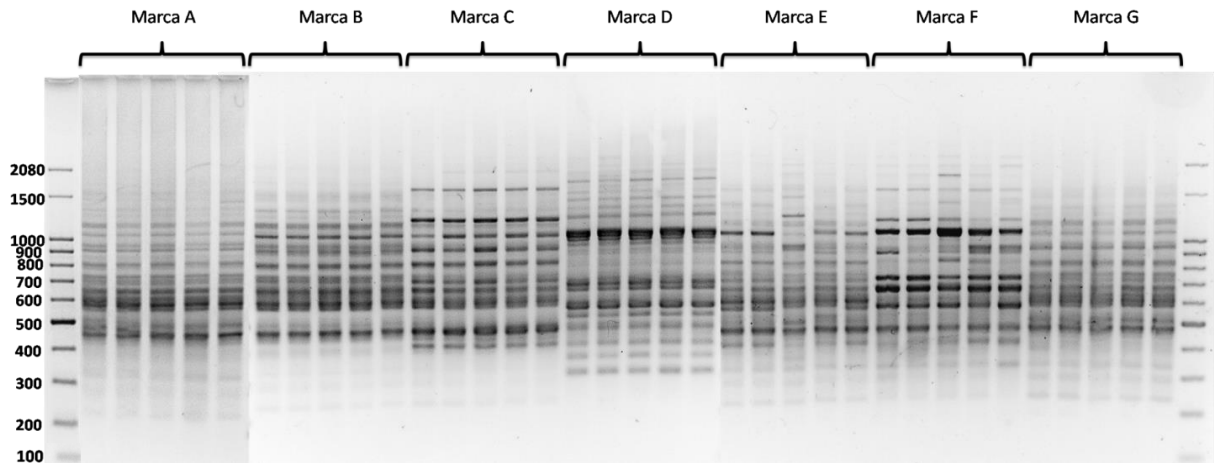


Figura 5. *Fingerprint* obtido após aplicação de fragmentos do genoma bacteriano por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras de queijos.

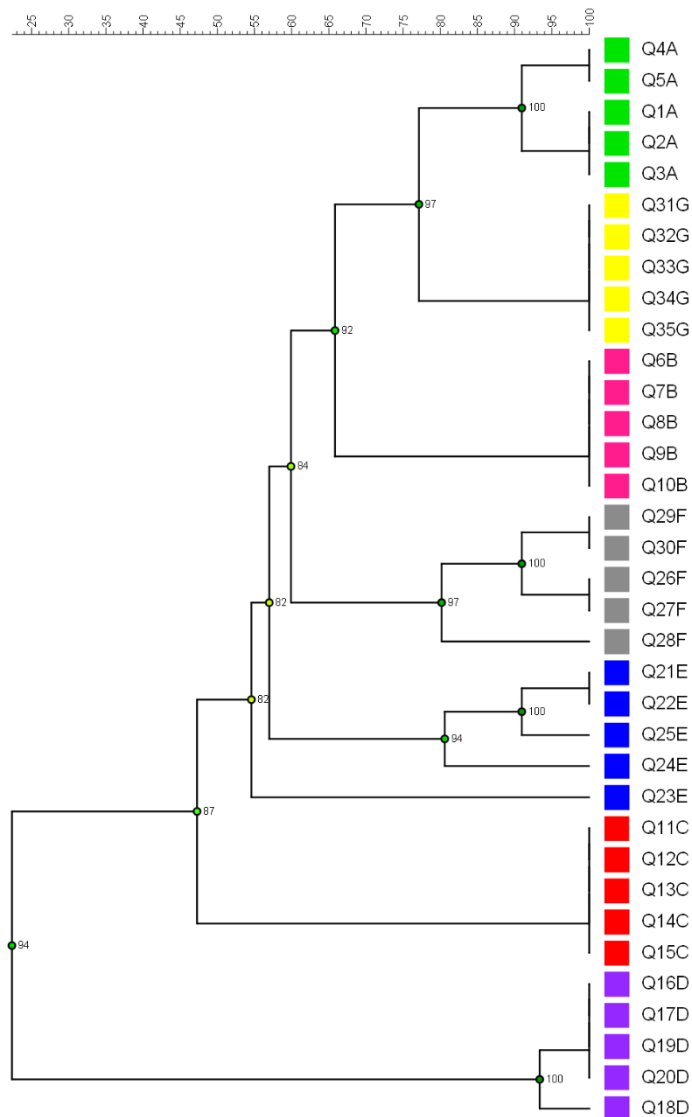


Figura 6. Dendrograma obtido pela análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do genoma bacteriano amplificados por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras de queijos.

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

O *fingerprint* obtido nos experimentos de PCR-DGGE foi considerado para avaliar a estrutura da comunidade bacteriana láctea nas amostras de queijo Minas Frescal analisadas. A partir dos *fingerprints* obtidos foi construída uma matriz para presença e ausência das bandas identificadas com posterior análise por agrupamento UPGMA e geração de um dendrograma de similaridade. 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. A única exceção foi a amostra Q4A, que não se agrupou com as demais amostras da marca A. 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 (similaridades menor que 20%).

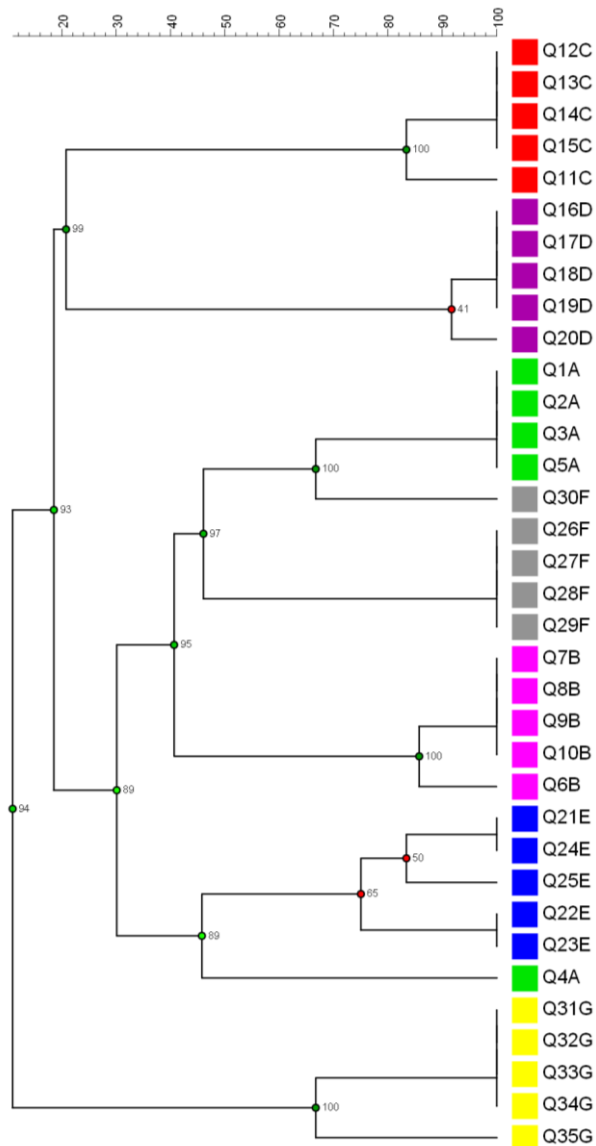


Figura 7: DGGE *fingerprint* e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene bacteriano DNAr 16S específicos para o grupo de bactérias lácticas amplificados a partir do DNA metagenômico extraído das amostras de queijos.

Cada banda visualizada no gel foi considerada uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU). O número de bandas foi considerado um indicativo aproximado para a avaliação de riqueza com relação ao grupo de bactérias lácticas, que dentre as amostras avaliadas, foi maior nas amostras das marcas B e E (tabela 4).

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	5,0	6,8	5,8	5,0	6,6	4,6	2,2
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. A figura 8 revela a porcentagem de ocorrência dos marcadores de resistência entre as 35 amostras de queijo, de acordo com as classes farmacológicas. Do total de 40 marcadores investigados, 14 foram detectados, os quais estão relacionados a tetraciclinas, beta-lactâmicos, sulfonamidas, quinolonas e aminoglicosídeos. Também foram detectados marcadores relacionados a presença de bombas de efluxo, que podem conferir resistência cruzada a diferentes classes de antibióticos. Por outro lado, os marcadores de resistência relacionados a macrolídeos, lincosaminas, streptograminas 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*, *blaTEM*, *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*.

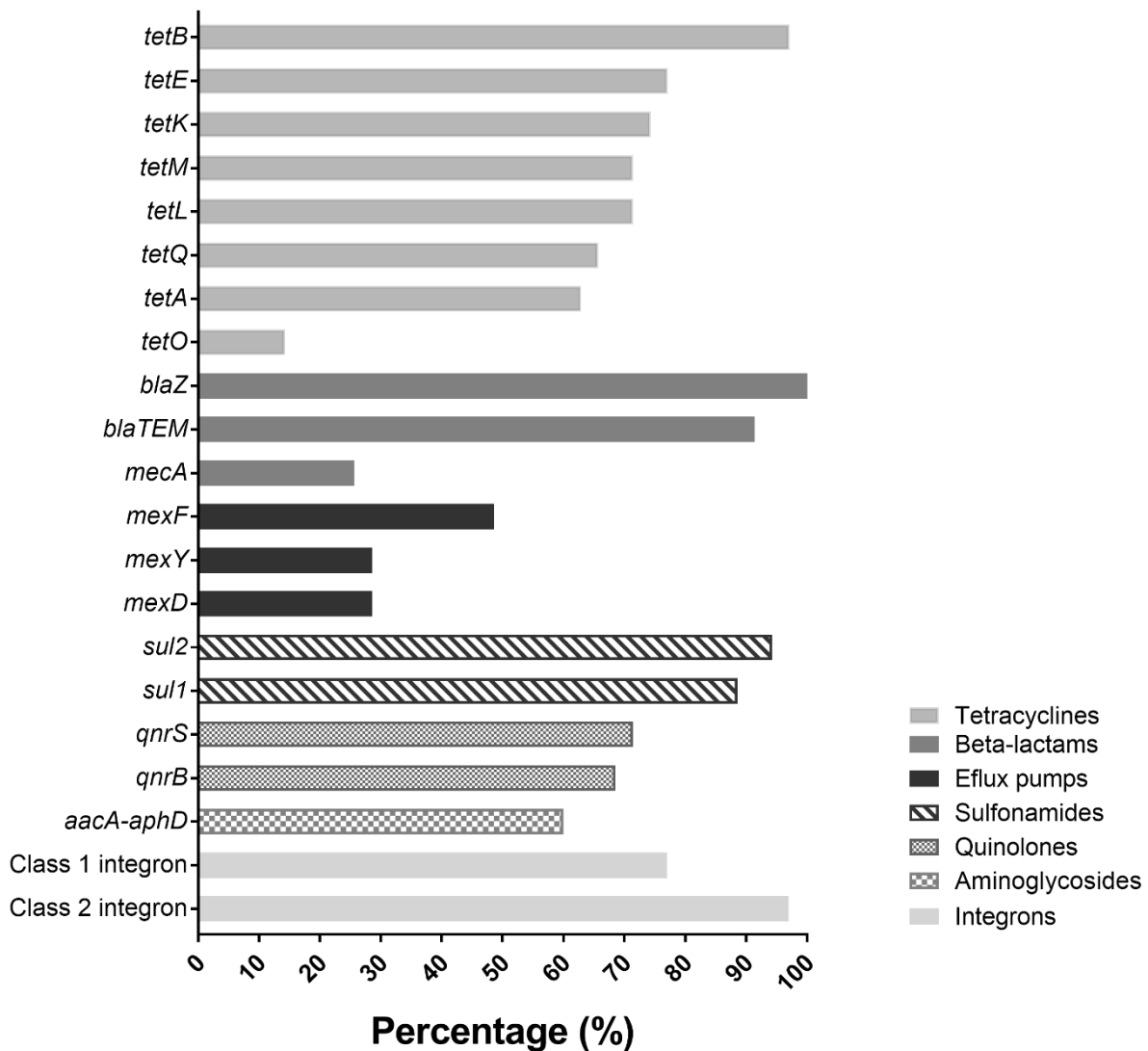


Figura 8. Frequência de detecção dos marcadores genéticos de resistência

Cada marca avaliada apresentou um perfil de ocorrência de marcadores de resistência particular e a co-ocorrência 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 de resistência (Figura 10).

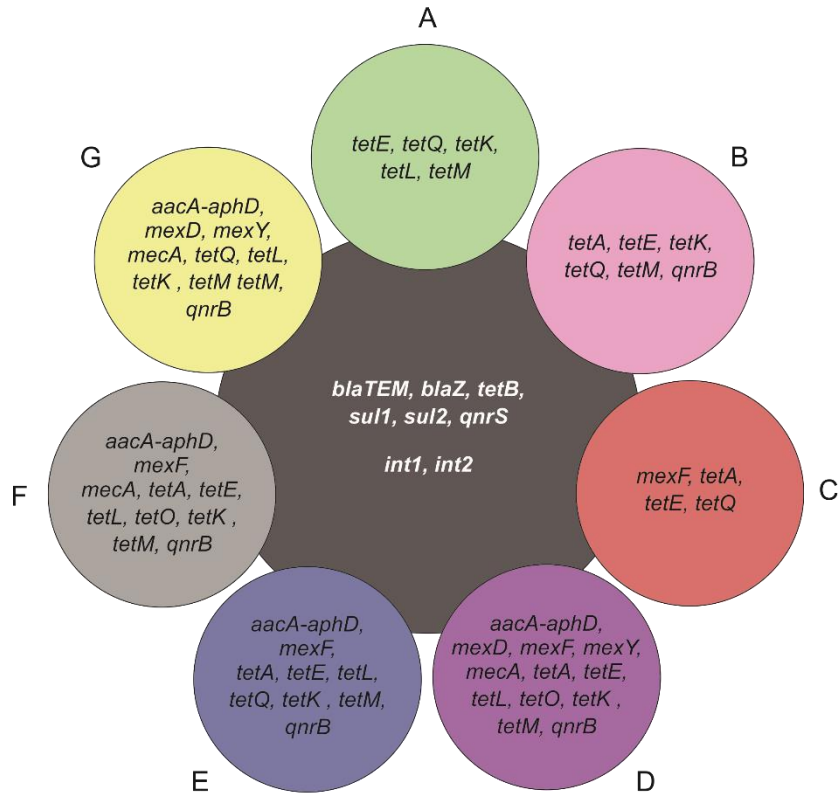


Figura 9. Perfil de ocorrência dos marcadores genéticos de resistência entre as marcas de queijos

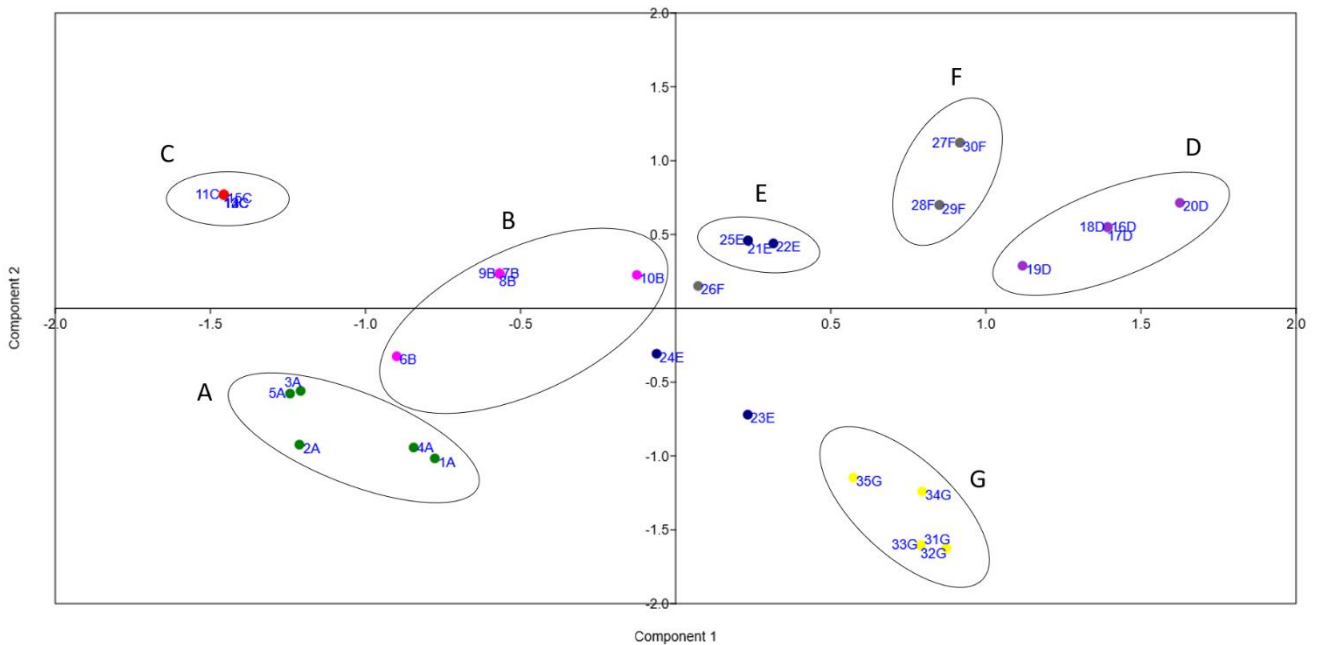


Figura 10. Agrupamento das amostras de queijo baseado na ocorrência dos marcadores genéticos de resistência, utilizando uma análise de componente principal (PCA)



A avaliação da presença de integrons baseada na PCR foi realizada para as 35 amostras desse estudo, utilizando primers específicos para 3 diferentes genes *intl* (*intl1*, *intl2* e *intl3*). 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 (Figura 9). Integrons de classe 3 não foram detectados entre as amostras.

## 6. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos relacionados ao queijo Minas é focada em suas características tecnológicas e sensoriais ou na ocorrência de microrganismos específicos utilizando-se 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 da cultura pode não revelar toda 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 abundante.

Nos últimos anos, metodologias independentes de cultivo baseadas em técnicas de biologia molecular tem sido empregadas para o estudo da microbiota dos 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* são capazes de gerar impressões genéticas 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*, podendo ser empregada como um rastreio prévio para posterior identificação por sequenciamento. No entanto, alguns estudos tem reportado que a técnica de rep-PCR também é uma ferramenta importante para avaliar a similaridade entre a microbiota de 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* 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 a amostra 23 apresentasse o mesmo número de lote, o rótulo constava que sua fabricação foi realizada 4 dias antes da data de fabricação das demais amostras. Essas informações podem suscitar questões a respeito do controle de qualidade, da origem da matéria prima e dos suprimentos 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 E 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.

Segundo Heras et al. (2016), a interpretação dos padrões de bandas pela observação visual pode às vezes ser complicada e altamente dependente do pesquisador que os lê. Apesar dos *fingerprints* 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 em supermercados 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 *fingerprints* observados entre as marcas. Um trabalho realizado por Rocha, Buriti e Saad (2006) evidenciou a falta de padronização entre amostra de queijo Minas Frescal de 7 marcas diferentes adquiridas em supermercados, baseada em parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Por outra perspectiva, 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 tradicionais 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 cru, 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 láctea presente nas amostras avaliadas, considerando

que a estrutura microbiana global das amostras foi caracterizada por rep-PCR. O uso de *primers* 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 *primers* específicos utilizados no PCR-DGGE deste estudo, 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 *primers* específicos para bactérias lácticas no estudo da microbiota de queijos.

O DNA de todas as amostras de queijos avaliadas no estudo foi amplificado a partir da PCR utilizando-se os *primers* específicos. 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 das diferenças no processo de fabricação e da pasteurização sobre a microbiota láctea, e alguns viés que podem ser gerados pela 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 microbiota láctea.

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 cru 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

láctea 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 cru 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 láctea.

Segundo Ndoye et al. (2011), a lise diferencial de populações 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, 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 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 no 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 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 transmissão e disseminação de genes de resistência durante a fabricação e após o consumo dos queijos Minas Frescal.

De acordo com Verraes et al. (2013) os alimentos podem ser contaminados com genes de resistência antimicrobiana de várias maneiras. O uso de antibióticos em animais para prevenção, tratamento e promoção do crescimento seleciona bactérias resistentes que podem espalhar ao longo da cadeia de produção de alimentos até os consumidores, podendo levar a resistência cruzada com antibióticos utilizados na medicina humana. Os produtos alimentares também podem ser

contaminados com genes de resistência durante o seu processamento e manuseio, através da contaminação cruzada com bactérias resistentes aos antimicrobianos.

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. Embora as tetraciclinas sejam bem conhecidas pelo seu amplo espectro de atividade para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a disseminação de mecanismos resistentes 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. Genes de resistência à tetraciclina já foram anteriormente relatados em bactérias lácticas (LAB) isoladas de produtos lácteos (DIVIRGILLIS et al., 2008; HUYS et al., 2004), bem como diretamente a partir do DNA da microbiota de queijos. Flórez et al. (2014) também 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 tem 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. Em conjunto, esses resultados podem levantar 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 pode ser preocupante. A produção de ESBLs tem sido amplamente associada a enterobactérias, muitas das quais apresentam relevância clínica e relação com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não. Além disso, 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 presença do gene *blaTEM* em queijos já foi relatada por Amador et al. (2009), o qual foi detectado em isolados pertencentes a família Enterobacteriaceae.

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 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).

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. 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 (LAB) 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.

As bombas de efluxo são sistemas bacterianos que possuem um importante papel fisiológico, atuando ativamente no transporte de diversos compostos nocivos à célula, como metais pesados, corantes, detergentes, solventes orgânicos, entre outros (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 habilidade 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 relacionados a expressão de bombas de efluxo detectados neste estudo, codificam transportadores do tipo Mex (*mexD*, *mexF* e *mexY*), os quais fazem parte de um dos sistemas de efluxo mais comuns em *Pseudomonas aeruginosa*.

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. O gene *sul1* normalmente é encontrado relacionado a outros genes de resistência na região conservada dos integrons de classe 1. Ahmed et al. [68] encontraram uma associação positiva entre genes *qnrS1* com integrons de classe 1 que transportavam cassete gênico de resistência a aminoglicosídeos em todos os isolados de Enterobacteriaceae a partir de amostras de queijo.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Informações sobre tipos de queijo no Brasil**. Disponível em: <[www.abiq.com.br](http://www.abiq.com.br)>. Acesso em: 15/02/2017.
- 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 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.

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.

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.

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.

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)<sub>5</sub>-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>%5Cn<http://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.

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.

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.

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, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.
- 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.
- 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.; CISELL, 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.

- MEDVEĎOVÁ, 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

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

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.

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.

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 Veterinária 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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.