

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

GENOTIPIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESVAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE SUBCLINICA.

PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

GENOTIPIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESVAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE SUBCLINICA.

PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL

ORIENTADOR: JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA
VETERINÁRIA

LINHA DE PESQUISA: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE
DOENÇAS ANIMAIS E GESTÃO DOS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA

PUBLICAÇÃO: 17/2020

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

GENOTIPIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO
MINAS FRESCAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE SUBCLÍNICA.

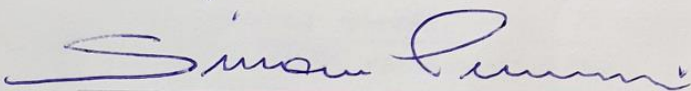
PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
SAÚDE ANIMAL

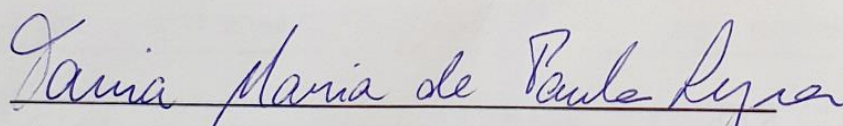
APROVADA POR:



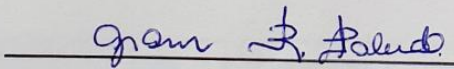
JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, Prof. Dr (UNB) (ORIENTADOR)



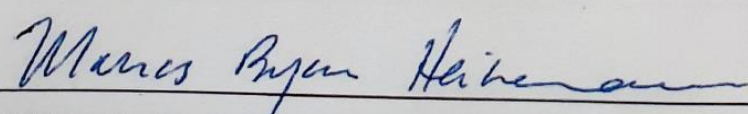
SIMONE PERECMANIS, Profa. Dra (UNB)



TÂNIA MARIA DE PAULA LYRA, Profa. Dra (UNB)



GIANE REGINA PALUDO, Profa. Dra (UNB)



MARCOS BRYAN HEINEMANN, Prof. Dr. (USP) (MEMBRO EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 17 DE FEVEREIRO DE 2020

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

POLL, P.S.E.M. Genotipificação de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas frescal e leite de bovinos com mastite subclínica. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 115p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P P771g Poll, Paula Suzana Elisa Maciel
GENOTIPIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE
QUEIJO MINAS FRESCAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE
SUBCLÍNICA. / Paula Suzana Elisa Maciel Poll; orientador
JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES. -- Brasília, 2020.
115 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Saúde Animal) --
Universidade de Brasília, 2020.

1. Microbiologia de alimentos. 2. Medicina veterinária
preventiva. 3. Doenças infecciosas dos animais. 4. Biologia
molecular. I. BORGES, JOSÉ RENATO JUNQUEIRA, orient. II.
Título.

RESUMO

Espécies do gênero *Staphylococcus* são bactérias oportunista presentes na microbiota normal de mamíferos e causa mastite bovina. Representa na área de qualidade de alimentos um risco a saúde pública por estar envolvido em surtos de intoxicação alimentar, pela presença dos genes de enterotoxinas e resistência aos antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi genotipificar *Staphylococcus aureus* oriundos do leite de vacas com mastite subclínica e queijo do tipo minas frescal fracionado, obtidas na região do Distrito Federal, Brasil. As amostras de queijo foram isoladas em Baird Parker, em seguida, colônias selecionadas foram identificadas a partir dos testes bioquímicos. Cepas caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positiva seguiram para análise molecular e antibiograma. As amostras de *S. aureus* do leite mastítico utilizadas foram do banco de germoplasma do laboratório de microbiologia clínica veterinária da UNB. Após extração do DNA total, foi executada a PCR com primers: espécie-específico AroA, enterotoxinas SEA, SEC e SEE, e resistência MecA. Dentre o grupo amostral de 134 queijos coletados, 54 amostras foram detectadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positivas, e após PCR do gene AroA espécie específico foram identificados 38 *S. aureus*. Das estirpes do leite mastítico bovino foram caracterizados 55 *S. aureus*. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi realizada em 21 linhagens selecionadas aleatoriamente, sendo 18/38 de linhagens do queijo e 3/55 da linhagem do leite mastítico. Todas as cepas foram positivas para os genes AroA e CoA (93). Foi detectada a predominância do gene COA de 600pb nas linhagens oriundas do leite (33/55) e do queijo (16/38). Observou-se a presença de enterotoxina estafilocócica em 16 (SEA), 4 (SEC) e 16 (SEE) isolados de *S. aureus* no leite; e 6 (SEA), 2 (SEC) e 2 (SEE) em isolados de queijo. Dentre os queijos avaliados foi encontrado um predomínio de cepas enterotoxigênicas na região Guará (Central Adjacente) (4/10) e no ponto de venda informal (7/10). Um isolado de *S. aureus* do estudo foi identificado o gene MecA (MRSA), originária do queijo de São Sebastião (Leste) comercializado em uma casa de frios. Trinta e seis (36/38) *S.aureus* isolados do queijo apresentaram resistência a droga ceftazidima. Na análise PFGE, foram detectados 19 perfis, todas com similaridade genotípica acima de 70%. Foram encontrados 2 clones, um entre cepas originária do leite e queijo e outro do queijo de diferentes regiões. A correspondência genotípica analisada entre as linhagens estudadas sugere contaminação de origem animal, e a manutenção das mesmas linhagens através da cadeia produtiva a partir da matéria-prima. Este resultado implica provável falha de pasteurização e manuseio no processo produtivo, reforçando a necessidade de melhores medidas de controle de higiene alimentar.

Palavras-chaves: Microbiologia de alimentos. Segurança alimentar. Derivados lácteos. Patógeno de origem alimentar. Doenças transmitidas por alimentos

ABSTRACT

Staphylococcus genus species are opportunistic bacteria present in the normal mammalian microbiota and may cause bovine mastitis. In the area of food quality, it represents a public health risk since it is involved in outbreaks of food poisoning due to the presence of enterotoxin genes and antimicrobials resistance. The aim of this work was to genotype *Staphylococcus aureus* from cow milk with subclinical mastitis and fractional Minas fresh cheese, obtained in the Federal District, Brazil. The cheese samples were isolated in Baird Parker from which selected colonies were identified by biochemical tests. Strains characterized as coagulase positive *Staphylococcus* were then evaluated by both molecular analysis and antibiogram. The *S. aureus* samples from mastitic milk used were from the germplasm bank of the UNB veterinary clinical microbiology laboratory. After total DNA extraction, PCR was performed with the following primers: species-specific AroA, enterotoxins SEA, SEC and SEE, and MecA resistance. Within the sample group where 134 cheeses were collected, 54 samples were detected with the presence of coagulase positive *Staphylococcus*, and after PCR of the specific species AroA gene 38 *S. aureus* were identified. 55 *S. aureus* were characterized from bovine mastitic milk strains. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed on 21 strains randomly selected: 18/38 of the cheese and 3/55 of the mastitic milk. All strains were positive for AroA and CoA genes (93). The predominance of the 600bp COA gene amplicon was detected from milk (33/55) and cheese strains (16/38). Staphylococcal enterotoxin was observed in 16 (SEA), 4 (SEC) and 16 (SEE) *S. aureus* isolates in milk; and 6 (SEA), 2 (SEC) and 2 (SEE) isolates in cheese. Among the evaluated cheeses, a predominance of enterotoxigenic strains was found in the Guara region (Central Adjacent) (4/10) and at the informal point of sale (7/10). A *S. aureus* isolate from the study was identified with the MecA gene (MRSA), originating from Sao Sebastiao cheese (East) sold in a cheese shop. Thirty-six (36/38) *S. aureus* isolates in cheese showed ceftazidime drug resistance. In the PFGE analysis, 19 profiles were detected, all with genotypic similarity above 70%. Two clones were found, one between strains originating from milk and cheese, and the other from cheese, from different regions. The analyzed genotypic correspondence between the studied strains suggests animal origin contamination and the maintenance of the same strains through the production chain from the raw material. These results implies a probable failure during production process regarding the pasteurization and handling, reinforcing the need for better measures of food hygiene control.

Keywords: Food microbiology. Food security. Dairy products. Foodborne pathogen. Foodborne diseases

SUMÁRIO

CAPÍTULO I-----	1
1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. Objetivo geral-----	5
1.2. Objetivos específicos-----	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO-----	6
2.1. Realidade econômica do queijo no Brasil-----	6
2.2. Perspectivas para economia para o queijo brasileiro-----	7
2.3. Queijo-----	8
2.3.1. Minas frescal-----	11
2.3.2. Análises de riscos na fabricação-----	13
2.3.3. Leite-----	14
2.3.4. Fermentos inativos-----	21
2.3.5. Higiene-----	22
2.3.6. Embalagem, transporte e armazenamento-----	23
2.4. Microrganismos-----	25
2.4.1. Doenças Transmitida por Alimentos (DTA)-----	27
2.4.2. <i>Staphylococcus</i> spp.-----	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	41
CAPÍTULO II-----	48
1. INTRODUÇÃO-----	50
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	52
2.1. Obtenção das amostras:-----	52
2.2. Isolamento microbiológico:-----	53
2.3. Identificação bioquímica:-----	54
2.3.1. Extração do DNA total e identificação dos genes de virulência, MRSA e espécie-específico por PCR dos <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva-----	54
2.4. Teste de susceptibilidade antimicrobiana-----	55

2.5. Análise estatística -----	56
3. RESULTADOS-----	57
3.1. Localização geográfica e distribuição comercial de queijos tipo minas frescal contaminados por <i>Staphylococcus</i> spp.-----	57
3.2. Identificação molecular de cepas <i>Staphylococcus aureus</i> , genes de virulência, MRSA e antibiograma -----	60
4. DISCUSSÃO -----	65
5. CONCLUSÃO -----	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	70
CAPITULO III -----	74
1. INTRODUCTION -----	76
2. MATERIAL AND METHODS-----	78
2.1. Sampling -----	78
2.1.1. Minas fresh cheese -----	78
2.1.2. Bacterial strains from mastitic milk -----	78
2.2. Isolation and identification of <i>S. aureus</i> from minas fresh cheese-----	79
2.3. Molecular identification of <i>S. aureus</i> using PCR -----	79
2.4. Molecular typing of <i>S. aureus</i> using PFGE -----	81
2.5. Statistical analysis -----	81
3. RESULTS AND DISCUSSION -----	82
3.1. Identification of <i>S. aureus</i> in the examined samples of minas fresh cheese -----	82
3.2. Molecular characterization with coagulase gene of <i>S. aureus</i> strains recovered from mastitic milk and minas fresh cheese samples -----	82
3.3. Molecular enterotoxigenicity of <i>S. aureus</i> strains in milk and minas fresh cheese -----	85
3.4. MRSA strains detection in milk and minas fresh cheese-----	87
3.5. PFGE analysis-----	88
4. CONCLUSION -----	93
5. REFERENCES-----	94
ANEXO A -----	98
ANEXO B -----	99

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um dos produtos mais importantes no setor lácteo do Brasil, isso quer dizer que mais da metade de todo o leite produzido é destinado ao fabrico de queijos e que quase um quarto da venda dos produtos lácteos são queijos. Mesmo assim, a população brasileira ainda tem baixo consumo do produto em comparação a alguns países vizinhos. Apesar das incertezas sobre a economia da indústria láctea há previsões de um mercado em futura expansão para produtos lácteos como o queijo, para o mercado interno e internacional. Sua aceitabilidade e projeção depende principalmente da qualidade da matéria prima e produto final, com perspectiva de alto potencial de crescimento (Embrapa, 2019)

O queijo minas frescal, dentre os queijos consumidos, é o mais popular no Brasil, principalmente por seus nutrientes. No entanto é um alimento muito perecível, devida sua característica de fabricação que conta com uma massa crua e com elevada umidade. Em casos de baixa qualidade da matéria prima pode diminuir o período de validade do produto ou torná-lo um veiculador de doenças (Mercosul, 1996; Mercosul, 1998; Nunes, Mota e Caldas, 2013; Carvalho, Venturini e Galan, 2015).

Como todo produto lácteo, a pasteurização é um fator importante e necessário na inativação de microrganismos patógenos que podem comprometer a saúde do consumidor. Erros na execução, ou mesmo a não pasteurização do leite não garante

uma matéria prima livre de patógenos e conseqüentemente segura. Para a garantia de um produto de qualidade são imprescindíveis o tratamento térmico correto associado as demais boas práticas de fabricação (Brasil, 1997a).

Algumas propriedades leiteiras brasileiras, apresentam precariedade higiênico-sanitários, resultando na produção do leite cru com altos níveis de contaminação microbiológica. Conseqüentemente, a má qualidade do leite produzido influencia diretamente sobre a segurança alimentar dos consumidores de derivados lácteos (Fonseca e Santos, 2007; EFSA, 2015).

Uma das formas de contaminação do leite, ocorre por falha na sanidade e manejo do rebanho, acarretando o desenvolvimento de enfermidades. A principal doença que acomete os bovinos leiteiros e a mais importante na qualidade do leite é a mastite (Acosta et al., 2016, Lange et al., 2017).

A mastite é uma inflamação na glândula mamária, resultado de trauma ou lesão ao úbere, principalmente sendo provocada por microrganismos de origem bacteriana. A afecção é uma anomalia abordada como uma questão de saúde pública, mas também de relevância econômica mundial, pois impacta negativamente sobre o desempenho do rebanho leiteiro de todo o globo. Representa elevadas expensas financeiras direta e indiretamente como: descarte de leite, redução na produção e na qualidade do leite, aumento do risco de abate precoce e ocasionalmente a mortalidade (Fonseca e Santos, 2007).

A bactéria Gram-positiva cocóide *Staphylococcus* spp. está entre os principais agentes provocadores da mastite bovina. Por ser gênero que está amplamente disseminado no ambiente e coloniza assintomaticamente a pele de humanos e

animais. Não apenas está envolvido na infecção da glândula mamária bovina, como também é responsável por uma infinidade de infecções no mundo (Johler et al., 2015).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais frequentes. Ocorre devido ao consumo de alimentos contaminados por toxinas que são produzidas principalmente pela espécie *S. aureus*, especialmente em produtos lácteos, podendo ocasionar mortalidade em indivíduos predispostos (CDC 2003; Garcia e Duarte 2014).

A produção dessas enterotoxinas termoestáveis ocorre principalmente em condições favoráveis para a multiplicação do agente. São 5 subtipos de toxinas envolvidos nos surtos mundiais SEA, SEB, SEC, SED e SEE que provocam a intoxicação. O curso clínico da intoxicação estafilocócica se inicia em poucas horas após a ingestão, com sintomatologia emética e / ou diarreica (Fox, Jiang e Gobius, 2018).

Além das enterotoxinas, a importância clínica na presença do *S. aureus* está associada a habilidade no desenvolvimento de resistência a antibióticos rotineiramente utilizados, a capacidade de mobilidade de elementos genéticos envolvidos na transmissão de múltiplos genes de resistência, com repasse a outros gêneros e uma série de fatores de virulência (Johler et al., 2015; Malachowa et al., 2016; Oliveira, Borges e Simões, 2018).

O risco do contágio por *Staphylococcus aureus*, pode avançar para infecções que cursem com dificuldade de tratamento, seja de estirpes oriundas da comunidade como do serviço de saúde, e podem variar de brandas a fatais. Todos esses fatores, refletem a importância deste microrganismo, que se espalha por diferentes continentes (Venkatesh, 2018).

Dessa forma, os *Staphylococcus aureus* afetam anualmente cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, e nos EUA estima-se que 20 mil pessoas venham a óbito pela infecção (Ko et al., 2016). Segundo OMS (1995) em países desenvolvidos, uma média de 70% dos casos de diarreia em crianças com idade próxima de cinco anos, é de origem alimentar.

No Brasil, de acordo com o DATASUS, em 2013, mais de 340 mil internações foram notificadas por infecções gastrointestinais, custando R\$ 121 milhões em despesas públicas. No entanto existem poucas informações a respeito das DTAs, no país, seja por falta de investigação ou notificação dos casos (Pereira et al., 1994, Brasil, 2014; Lima et al., 2015).

Staphylococcus aureus produzem um forte impacto negativo em saúde pública. Isso se deve a suas capacidades em provocar doenças, toxinfecções, evasão do sistema imune, resistência a antibióticos e outros elementos genéticos característicos da espécie, reflexo de sua habilidade evolutiva. A compreensão do agente e determinação do perfil epidemiológico e genético dos *Staphylococcus aureus* fornecem subsídios para prevenção e outras medidas que minimizem as infecções e toxinfecções à população (Ko et al., 2016).

1.1. Objetivo geral

Genotipificar estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastites subclínicas em bovinos e isoladas de queijo minas frescal na região do Distrito Federal.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na região;
- Identificar estirpes de *S. aureus* toxigênicas do leite mastítico e queijo minas frescal;
- Correlacionar os perfis gênicos de *S. aureus* por padrões do gene COA oriundos do leite e queijo;
- Estabelecer possível fonte (humana ou animal) principal de contaminação dos queijos minas frescal comercializados no DF.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Realidade econômica do queijo no Brasil

Estima-se que o Brasil produza mais de 33 bilhões de litros de leite anualmente, e o principal destino de todo esse leite é para a produção de queijos, o que resulta em 1,15 milhão de toneladas de queijo formal, inspecionado, e cerca de 300 mil toneladas de queijo informal, não inspecionado. O consumo per capita de queijo formal nacional e importado por ano é de 5,6 kg. Ao considerar todo o queijo disponível no mercado, esse consumo aumenta para 7,2 kg per capita/ano, o que corresponde a 33% do leite consumido. Contudo o consumo de queijo no país ainda está muito abaixo do seu real potencial, considerando a Argentina (11kg per capita/ano), país vizinho e em condições de desenvolvimento semelhantes ao Brasil, ou países desenvolvidos (acima de 20kg per capita/ano) (Rocha, 2014; Sorio, 2018).

Nos últimos 10 anos vem aumentando os índices de crescimento do consumo de leite, fator este impulsionado pelos queijos, considerados o segundo principal derivado lácteo com a melhor porcentagem de venda, responsável por mais de 20%, em 2016, mas com índices muito próximos ao primeiro lugar, o leite longa vida. E dentre todos os produtos lácteos, os queijos detém da maior taxa de crescimento (124%). Os principais representantes do segundo maior sucesso de vendas da indústria láctea, mais consumidos aqui, são os queijos considerados de mesa, aqueles mais comuns como: muçarela, prato, minas (queijo branco) e requeijão, figura 1.1 (Embrapa 2019).

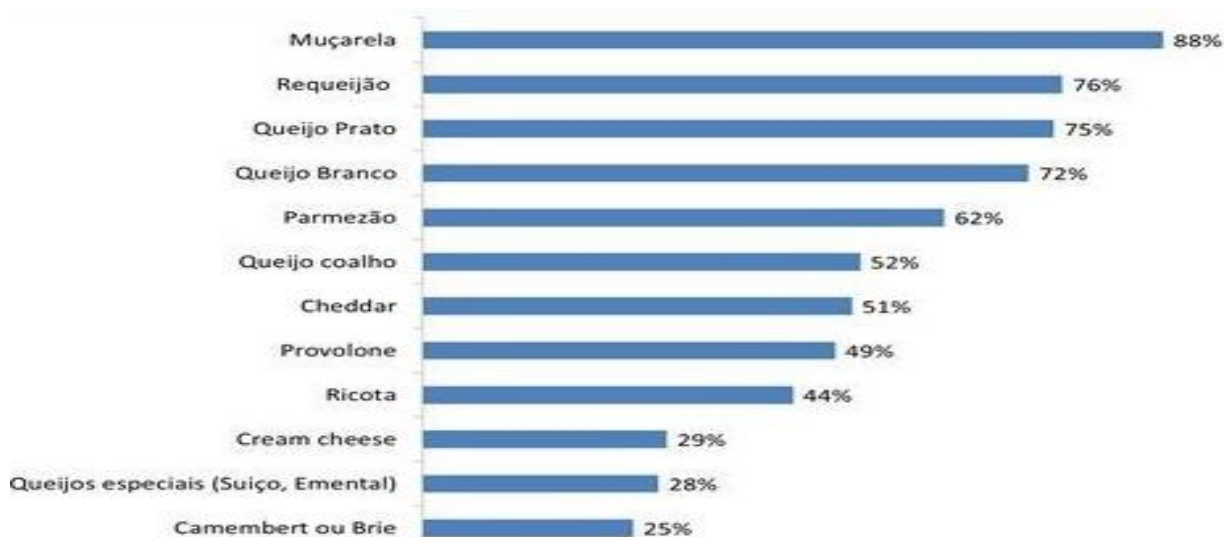


Figura 1.1: Perfil de consumo dos diferentes tipos de queijos na população adulta brasileira (Carvalho, Venturini e Galan, 2015).

2.2. Perspectivas econômicas do queijo brasileiro

Há evidências de um mercado em futura expansão para os produtos lácteos como o queijo, principalmente para o mercado exterior. Isto se deve, tanto a queda da participação dos países desenvolvidos (de 5% em 2027) na produção de leite, e portanto, diminuição na produção global de queijos, evidente na União Europeia e Estados Unidos, considerados os principais exportadores de laticínios processados, assim como o crescimento da população, para a próxima década. O que conseqüentemente refletirá no consumo mundial de alimentos, de forma geral, associado a uma boa perspectiva para produção na safra de grãos brasileiros (OECD/FAO, 2018, Embrapa, 2019).

A aceitabilidade e projeção dos produtos lácteos brasileiros para que se torne um ator importante no mercado internacional depende de fatores de políticas públicas e principalmente da qualidade da matéria prima e do produto final. O que resultaria em perspectiva de alto potencial de crescimento para todo o país (Embrapa, 2019).

Ao passo que, internamente, o Brasil possui alto potencial expansivo para a demanda individual, quando contrastado ao consumo de outros países, com valores acima de 27 kg de queijo por indivíduo/ ano, é possível notar a gigantesca diferença com 7kg per capita/ano brasileiros. Seja abrangendo negócios interno ou de exportação, o setor lácteo possui alto potencial, mas a certeza de um grande desafio para a cadeia produtiva (Sorrio, 2018).

As principais incertezas sobre a indústria láctea e seu desempenho incidem sobre o consumo interno, uma vez que a demanda por seus produtos é prioritariamente influenciada pela economia, ou seja, a partir do incremento de renda da população. Outro fator influenciador, mas neste caso possível de ser manipulado pela indústria para potencializar a eficácia do sistema agroindustrial e dessa forma aprimorar a demanda, está em entender e atender às necessidades do consumidor e investir em lançamentos e inovações, criando vantagens competitivas e ocupando novos segmentos e tendências do mercado (Embrapa, 2019).

O setor também necessita estar atento as mudanças da atualidade, pois a era da informação também atinge aos consumidores que estão cada vez mais exigentes, buscam alimentos saudáveis, demandam padrões de segurança e qualidade por toda a cadeia produtiva, mas também procuram por produtos ecologicamente corretos, que se preocupam com o meio ambiente e sociedade, que atendam padrões de bem estar animal, sem abrir mão do sabor, da nutrição ou da conveniência. É um mercado em transformação que ao mesmo tempo gera oportunidades e desafios, que podem nortear a inovação nas indústrias lácteas no Brasil (Sorrio, 2018).

2.3. Queijo

O queijo surgiu a partir da domesticação dos bovinos, e foi desenvolvido para conservação do leite. Existem relatos de sua fabricação a datar do ano 2800 A.C. que perdura até a atualidade fazendo parte da rotina alimentar da maioria da população brasileira, sendo um produto de ampla aceitação, principalmente apreciado pelo valor nutritivo. A aceitação e demanda no consumo pela população é incentivado pela qualidade e preços relativamente acessíveis (Paula, Carvalho e Furtado, 2009; Vinha et al, 2010).

Corresponde a um dos alimentos de principal fonte proteica presente na alimentação humana, e dentre os derivados lácteos trata-se do produto mais consumido. Os motivos para seu alto consumo são atribuídos a versatilidade, variedades e principalmente ao sabor e valor nutricional (Visotto et al., 2011). Em termos legais o queijo tem sua denominação reservada aos produtos de base láctea, que não contenha substâncias como gordura e/ou proteínas de origem não láctea (Brasil, 1996).

São comercializados no globo quase mil variações, cujo processo básico de fabricação é semelhante. Cada tipo de queijo pode variar em diferentes aspectos como a origem do leite, metodologias do processamento, tempo e técnica de maturação. Falhas em qualquer etapa desse processamento ou armazenamento do produto representam risco a saúde pública. Uma das ameaças mais importantes, é a presença de microrganismos patogênicos veiculados nesses alimentos, principalmente em queijos frescos e macios, com alto teor de água que fornecem um ambiente propício a sua multiplicação. São exemplos de bactérias patogênicas relevantes identificadas em surtos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (Visotto et al., 2011).

Uma importante metodologia, que minimiza a veiculação dos patógenos é o tratamento térmico por meios mecânicos como a pasteurização, exigida pela legislação (Brasil, 1969). No entanto a realidade brasileira está aquém da prevista em legislação, sendo exorbitante o número de queijos minas frescal disponíveis à venda fora dessas especificações (Apolinário, Santos e Lavorato, 2014; Silva et al., 2016).

De acordo com as características do mercado de queijos no Brasil, os queijos podem se enquadrar em diferentes definições (Chalita, 2012):

Queijos comuns: produzidos pela indústria, são padronizados, não apresentam sabor, Aroma e textura que se destacam. Podem estar incluídos aqueles com denominações regionais tradicionalmente oriundos da produção artesanal.

Queijos finos ou especiais: são produzidos pela indústria em pequena escala, visando uma estratégia comercial de manutenção de preços elevados. São queijos que portam os nomes-tipos genéricos de queijos europeus, mas que não possuem certificação de origem dos países respectivos. O mercado de queijos finos brasileiro tem forte dependência da flutuação dos queijos importados de mesmo nome.

Queijos artesanais: são produzidos tradicionalmente, e dessa forma tem estreita dependência com a qualidade do solo, matéria-prima, alimentação dos animais e práticas de elaboração. Antigamente, sua comercialização se estruturava em redes de distribuição informais, esparsas ou próximas ao local de produção, sem garantia de qualidade. Por serem mais baratos, podia lhes ser imputado uma imagem de qualidade inferior.

No entanto, foi promulgado no ano de 2019 a Lei 13.860, para os queijos tradicionais de fabricação artesanal, pois normalmente são pouco maturados e fabricados a partir de matéria prima de leite cru, e não atendiam à legislação vigente

no país (Brasil, 2019; Brasil, 1969). Dessa forma sua comercialização, até então, era clandestina e informal, com produtos sem inspeção ou controle de qualidade. A nova legislação visa uma comercialização alternativa legal para os pequenos produtores de leite, com objetivo de agregar maior valor ao queijo, certificando-o e garantindo sua segurança alimentar, incentivar esses produtores, gerar emprego e assim melhorar a qualidade de vida rural (Brasil, 2019).

2.3.1. Minas frescal

A técnica de fabricação originária do Minas Frescal chegou com os Portugueses, no século XVIII, que seguiam em numerosas expedições para a região do estado de Minas Gerais para exploração mineral. O objetivo da técnica, que foi adaptada, era aumentar a durabilidade do leite, devido ao clima tropical do Brasil (Ribeiro, Simões e Jurkiewicz, 2009; Pereira, 2014).

De acordo com Resolução MERCOSUL GMC nº145/96 e Portaria nº 352/97, o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido a partir de uma massa coalhada por coagulação enzimática do leite pasteurizado, podendo ser complementada com ação de bactérias lácticas específicas, não prensada, dessorada, salgada e não maturada (Mercosul, 1996).

Caracterizado como um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, de consistência macia, cor esbranquiçada, textura compacta e sabor suave à levemente ácido, de forma cilíndrica e pesando entre 0,3 a 5kg. Acondicionado em embalagem plástica ou em envases apropriados, mantidos a uma temperatura máxima a 8°C (Mercosul, 1996; Mercosul 1998). Em consequência por suas propriedades, isto o torna um produto perecível, susceptível a manifestações bioquímicas e

microbiológicas que afetam sua qualidade, rendimento e durabilidade, apresentando uma vida de prateleira curta, mesmo sob condições adequadas de refrigeração.

O queijo Minas Frescal pode ser considerado o único derivado lácteo produzido artesanal e industrialmente que é genuinamente nacional, de simples elaboração e alto rendimento de fabricação. No decorrer dos anos foram encontradas variantes tecnológicas para a sua produção, como: pasteurização, adição de fermento ou ácido láctico, ultrafiltração, entre outros (Carvalho, Viotto e Kuaye, 2007; Ribeiro, Simões e Jurkiewicz, 2009).

As variações no preparo interferem sobre os parâmetros físico-químicos encontrados nos queijos comercializados, mas de forma geral os valores de referência para tais parâmetros encontrados em queijos Minas Frescal, para gordura, são: queijos semi-gordo devem conter entre 25,0 e 44,9%; enquanto umidade: para queijos de muita alta umidade (conhecidos como de massa branda ou "mole") não pode ser inferior a 55,0%, teor de sal baixa entre 1,4% e 1,6%; e pH entre 5,0 e 5,3 (Brasil, 1996; Sangaletti et al., 2009).

Aditivos utilizados para a fabricação do queijo de muito alto teor de umidade, permitidos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos são: ácido cítrico, láctico e acético para regular acidez; aromatizantes; nisina, ácido sóbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio e natamicina para conservantes; clorofila crúpica, sais de sódio e potássio em clorofila, cúrcuma, curcumina, carmim e betacaroteno sintético para corantes; e carboximetil celulose, carragenina, amido modificados, alginato de potássio, pectina ou pectina amidada, ácido algínico, seus sais de amônio, cálcio, e sódio, alginato de propilenoglicol, ágar e gomas guar, de algaroba ou jataí, xantana, karaya e arábica para espessantes e estabilizantes (Brasil, 1996).

2.3.2. Análises de riscos na fabricação

Segundo a FAO (2017) a gerência de risco de segurança alimentar é encarregada de proteger a saúde e a segurança pública, sendo capaz de, na complexidade da atualidade, fazer boas escolhas referente aos riscos à saúde pública, mas considerando os impactos econômicos, sociais e políticos regionais e mundiais.

É importante ressaltar que a saúde, sociedade e os alimentos estão em íntima conexão. Pois para que haja saúde e qualidade de vida é necessário a presença de alimento em quantidade e qualidade mínimas disponíveis a população. Os alimentos de origem animal, em especial, são aqueles com elevado risco à saúde do consumidor, devido à riqueza nutricional em sua composição e por isso estão sujeitos a rápida deterioração (Germano e Germano, 2011)

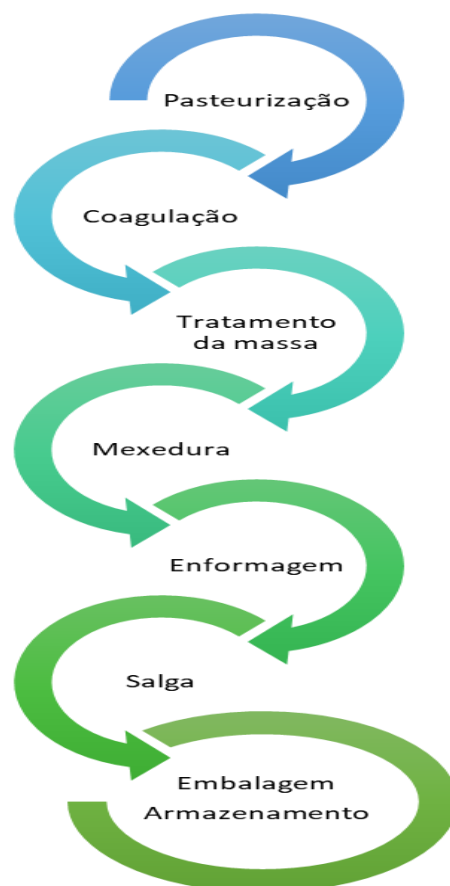


Figura1.2: Etapas básicas do processo de produção de queijo Minas Frescal.

O queijo apresenta diversos pontos críticos presentes em toda a cadeia de elaboração, agregado ao seu elevado valor nutritivo, o que favorece a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos. A contaminação do produto pode ser originária desde a ponta inicial do processo, que começa com a saúde e alimentação do animal, elaboração e coleta da matéria prima, na fabricação, processamento, empacotamento, transporte, preparação, distribuição, armazenamento da indústria ou na exposição dos alimentos à comercialização e até mesmo na casa do consumidor, o queijo pode ser exposto à contaminantes inclusive toxigênicos (Figura 1.2) (Visotto et al., 2011).

Falhas na cadeia produtiva ou exposição a temperaturas inadequadas podem permitir a sobrevivência e proliferação de bactérias patogênicas e fungos, o que pode culminar no acúmulo de toxinas, contribuindo efetivamente na má qualidade e insegurança do produto ao consumidor, configurando um importante elemento do ponto de vista da saúde pública (Nunes, Mota e Caldas, 2013).

2.3.3. Leite

O leite é a matéria-prima elementar do queijo. É considerado um alimento completo, composto por carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. Para o preparo dos derivados e manutenção de sua composição, a matéria-prima deve ser obtida em condições sanitárias adequadas e ser resfriado em seguida a ordenha, pois devido aos componentes no leite, esse se torna um excelente meio para o crescimento de microrganismos, afetando a qualidade do produto final (Figura 1.3) (Fonseca e Santos, 2007).

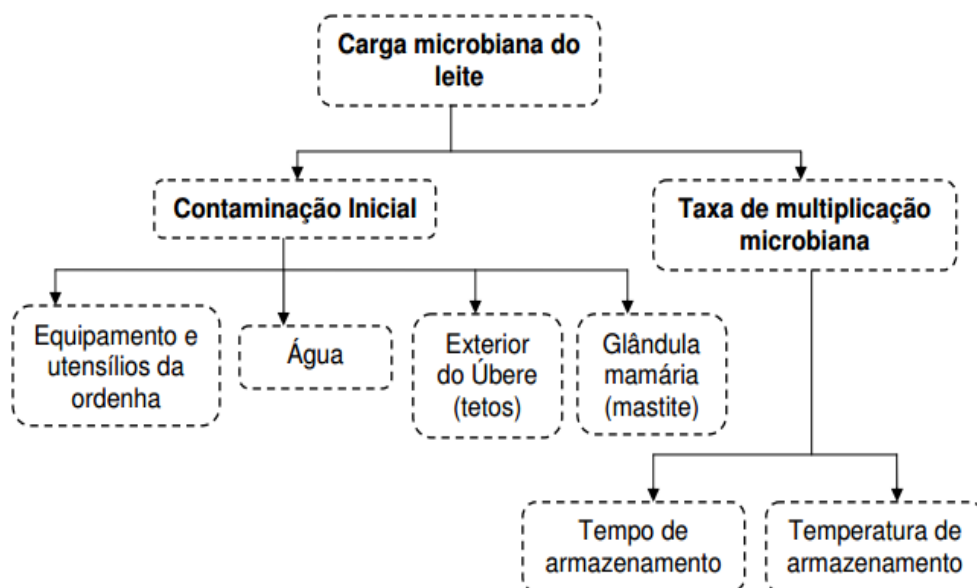


Figura 1.3: Principais fatores que afetam a carga microbiana do leite (Fonseca e Santos, 2007).

Um importante fator determinante na qualidade do lácteo é a sanidade do rebanho, pois o leite pode servir como veículo transmissor por indivíduos portadores, que funcionam como fontes de infecção, como: vírus da Hepatite E infecciosa (Huang et al., 2016), *Listeria* sp. (Sarfraz, Ashraf e Ashraf, 2017), *Mycobacterium* spp. (Bezerra et al., 2015) ou *Brucella* sp. (Silva, et al., 2016).

Pode ainda em casos de inflamação da glândula mamária, aumentar a incidência de microrganismos no leite, na qual já foram relatados a presença de mais de 80 agentes associados a infecção, sendo os mais frequentes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *E. coli* (Fagundes e Oliveira, 2004), dessa forma, disseminando patógenos interespecies, é apontado como risco potencial a saúde pública (Schmidt, Kock e Ehlers, 2017; Cobo-Angel et al., 2019).

Os microrganismos em contato com o leite, que é rico em nutrientes, podem se multiplicar exponencialmente, depreciando a qualidade do produto. Mas é importante ficar atento a qualidade do leite, já que microrganismos indesejáveis podem ser

transferidos ao ambiente de processamento. Sendo assim, o leite representa uma rota de entrada de patógenos, com potencial para impulsionar a contaminação cruzada dos produtos. Uma vez presente no ambiente, esses patógenos podem colonizar o local de processamento, e se tornar um risco de contaminação contínua da cadeia produtiva (Amaral et al., 2003; Fox, Jiang e Gobius, 2018).

A pasteurização é um procedimento para desinfecção térmica do leite, sem prejuízos nutricionais, visando a conservação dos produtos. No entanto posteriormente foram observados os benefícios na inativação de patógenos transmitidos pelo leite. Atualmente o tratamento térmico é utilizado para assegurar a sua inocuidade ao consumidor e diminuição da carga microbiana, especialmente tratando-se de patógenos de origem alimentar como *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis*, além de interromper a possível fonte de contaminação para as demais etapas de processamento (Brasil, 2011; Bezerra et al., 2015; Silva, et al., 2016; Fox, Jiang e Gobius, 2018).

Conforme a IN62 a pasteurização é realizada com o aquecimento de 72° a 75°C, sob fluxo turbulento, por 15 a 20 segundos, seguida de refrigeração não superior a 4°C, sendo observados os limites quanto à temperatura e ao tempo, fielmente, para a correta inativação de patógenos. Também são aceitos outros tipos de tratamentos térmicos, equivalentes à pasteurização clássica (Brasil, 2011).

A metodologia ajuda a alcançar os altos padrões de segurança dos laticínios e a confiança do consumidor. No entanto erros nos procedimentos favorecem a manutenção e surgimento da microbiota indesejável (Brasil, 2011, Sorio, 2018).

Apesar de anteriormente ser preconizado, na legislação brasileira, que o “leite deve ser pasteurizado para consumo humano direto ou para transformação em

derivados lácteos”, nem toda a produção de leite era processada pela indústria e submetida a inspeção, aproximadamente entre 5 e 9 bilhões de litros, não eram devidamente vistoriados por órgãos competentes (Brasil, 1969; Brasil, 2011; Sorio, 2018).

Era frequente a comercialização de queijos que não atendiam legalmente a essa especificação. Dentro da informalidade de queijos, estima-se que 2 bilhões de litros foram destinados à sua produção, gerando cerca de 300 mil toneladas de queijos diversos não inspecionados, destes 200 mil seriam comercializadas principalmente em feiras, mercado informal (Sorio, 2018).

Contudo no ano de 2019 passou a ser permitido a comercialização de produtos chamados “tradicionais” que permitem uma brecha para lácteos produzidos a partir de leite cru sem pasteurização (Brasil, 2019).

3.3.3.1. Mastite

A produção de leite é uma das principais atividades agropecuárias brasileira, pois é um dos setores de maior geração de renda e arrecadação tributária, tendo um impacto importante no âmbito social e econômico. Cabe salientar que mesmo o Brasil produzindo grande quantidade de leite, a qualidade da matéria prima representa um entrave ao desenvolvimento e à consolidação da indústria de laticínios, pois reflete diretamente sobre o produto final. A qualidade aquém do leite é relacionada na fazenda ao déficit do manejo, higiene na ordenha, limpeza e manutenção dos equipamentos, e principalmente da sanidade animal, com cuidado especial ao úbere (Lange et al., 2017).

A soma dessas falhas no processo produtivo induz ao aumento da prevalência e incidência de mastite no rebanho. A mastite ou inflamação da glândula mamária, pode ter origem diversas, sendo a infecciosa a mais comum. É a doença mais difundida na indústria leiteira bovina, com prevalências que podem aproximar de 30% (Acosta et al., 2016; Lange et al., 2017).

A mastite de origem infecciosa ocorre pela introdução do microrganismo ascendente através do canal do teto, e o quadro clínico da mastite será dependente dos fatores intrínsecos do agente em aderir, colonizar e multiplicar-se dentro da glândula mamária, o grau de virulência do microrganismo e capacidade de defesa do hospedeiro. À medida que o agente se espalha no tecido, tem-se a produção de toxinas que se acumulam, resultando em danos ao tecido local e que podem se estender de forma sistêmica (Acosta et al., 2016).

A fisiopatogenia da doença se inicia com a introdução do agente pelo teto, multiplicação utilizando nutrientes do leite, até alcançar os alvéolos, onde então a presença desses microrganismos atrai leucócitos e desencadeia uma resposta inflamatória com formação de edema e possível abscesso. Por fim, ocorre a substituição do tecido glandular afetado por tecido conjuntivo. (Lange et al., 2017; Fox, Jiang e Gobius, 2018).

Quando se tem a presença de uma resposta imune na glândula mamária, ocorre conseqüentemente o aumento na contagem de células somáticas (CCS). A análise de CCS refere-se a todas as células do leite, que inclui: leucócitos e células do epitélio glandular. Atualmente no Brasil este teste tem sido amplamente utilizado para determinar a sanidade do rebanho leiteiro, contendo informação para o diagnóstico da mastite subclínica. No entanto, valores de CCS podem ser influenciados por outros

fatores que não aqueles infecciosos, como período do ano ou estágio da lactação (Fonseca e Santos, 2007; Acosta et al., 2016).

A mastite pode ser caracterizada de acordo com as manifestações apresentadas na doença, a mastite clínica e subclínica. Na mastite clínica, o animal cursa com sinais evidentes da inflamação, tais como: algesia, edema, endurecimento da mama e hipertermia, e pode avançar para um quadro sistêmico, ou ainda estar associado a alterações do leite como grumos. Na forma subclínica não há sinais aparentes de uma doença, sua forma de diagnóstico se baseia em análises que determinam indiretamente o padrão inflamatório celular, como é o caso da contagem de células somáticas (Fonseca e Santos, 2007).

Outra forma para particularizar a mastite é por meio da identificação de seus agentes etiológicos, que podem ser classificados como: contagiosos e ambientais. Os contagiosos, como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, e *Corynebacterium bovis*, habitam e se multiplicam próximo ou dentro da glândula mamária, dessa forma, a sua transmissão ocorre entre animais ou durante a ordenha (Acosta et al., 2016).

Os agentes ambientais habitam no local de criação dos animais, e normalmente a infecção por estes agentes ocorre no período entre ordenhas. Essa causa de mastite está normalmente associada a baixa imunidade do animal ou má condições sanitárias da propriedade, tendo, por exemplo, os seguintes agentes como responsáveis: *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Prototheca zopfii*, leveduras e fungos (Acosta et al., 2016).

Acredita-se que a contaminação geral do ambiente agrícola é oriunda dos próprios animais. O processo de ordenha e a higiene geral da ordenha influenciam a

transmissão de microrganismos entre animais, para o leite cru e, conseqüentemente, para os produtos derivados. Dessa forma, a secreção láctea contaminada das vacas com mastite, eliminada durante a ordenha, segue até o tanque, contaminando o maquinário e todo o leite coletado (Fox, Jiang e Gobius, 2018).

Por isso se faz importante amplos programas de controle e prevenção de infecção da glândula mamária, pois os cuidados higiênicos e sanitários gerais evitam a contaminação do leite que se iniciam antes da ordenha e segue até o seu beneficiamento. Para isso o programa deve incluir e avaliar os fatores de risco diretamente ligados ao animal, como também do ambiente, manejo, equipamentos de ordenha, e essencialmente um suporte técnico acessível para auxiliar no gerenciamento de infecções dentro dos rebanhos, na prevenção da transmissão entre animais e no controle de patógenos. Globalmente o mais importante entre os patógenos de origem infecciosa, sendo os mais isolados dos casos de mastite é o *Staphylococcus aureus* (Lange et al., 2017).

3.3.3.2. Refrigeração

O leite recém-ordenhado deve ser armazenado em tanques de refrigeração por imersão comunitária ou própria, com temperatura máxima de 7°C, ou por expansão direta na qual a temperatura é mantida a 4°C, até a chegada do caminhão tanque. Para transporte do leite cru, pós-pasteurização e armazenamento ou envasamento do leite pasteurizado, o mesmo deve ser preservado em temperatura igual ou inferior a 4°C (Brasil, 2011).

Caso o leite seja destinado ao laticínio processador, este é acondicionado a 10°C, até a coagulação, que no caso exige, para a ação do fermento, que a

temperatura do leite atinja entre 32 a 34°C. Com o queijo pronto o transporte é realizado em ambiente climatizado entre 8 a 10°C, o armazenamento e comercialização a temperatura inferior a 8°C (Brasil, 2011).

Várias características do queijo Minas Frescal fazem dele um produto susceptível a contaminações, sendo assim a refrigeração torna-se importante no controle de contaminantes para minimizar o quadro de riscos, já que temperaturas baixas inibem a proliferação de microrganismos e produção de toxinas, e está presente em toda fabricação (Antunes, et al, 2006; Brasil, 2011).

2.3.4. Fermentos inativos

Para haver a formação da massa é necessária a coagulação da caseína (proteína do leite), ela acontece pela adição dos ingredientes: fermento, cloreto de cálcio, coalho e uma enzima coagulante (Mercosul, 1996).

O fermento é uma cultura de microrganismos selecionados, que participam na produção de fabricação de queijos. É composto basicamente por bactérias do gênero *Lactococcus* spp. classificado como mesófilo, ou seja, são microrganismos que apresentam crescimento excelente entre as temperaturas na faixa de 30°C e 37°C (Paula, Carvalho e Furtado, 2009).

Sua principal finalidade é a diminuição do pH, devida a metabolização da lactose e produção de ácido láctico, resultando na redução do crescimento de microrganismos indesejáveis, auxiliando na coagulação e retirada do soro e melhorando na consistência do coalho (Paula, Carvalho e Furtado, 2009).

Dessa forma o fermento adicionado ao leite tem um papel importante também na eliminação de bactérias desfavoráveis que possam ser oriundas de qualquer momento de elaboração do produto. A presença de fermentos inativados além de atrapalharem o processo de preparação da massa, ainda colabora com a propagação de agentes (Sangaletti et al., 2009).

2.3.5. Higiene

Para a produção dos derivados lácteos são necessárias condições higiênicas rígidas. Buscando evitar a entrada de substâncias estranhas assim como acesso e desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que possam modificar, diminuir o tempo de prateleira ou tornar o produto danoso à saúde do consumidor (Apolinário, Santos e Lavorato, 2014).

O cuidado se inicia com a qualidade da água, higiene e saúde pessoal dos manipuladores, que segue à limpeza e manutenção do ambiente de trabalho e utensílios. Dessa forma a sanitização deve ser realizada imediatamente antes e depois do uso, promovendo a limpeza das superfícies, com a eliminação de resíduos e supressão de microrganismos (CVE, 2008; Nunes, Mota e Caldas, 2013).

O procedimento geral de higienização é realizado em quatro etapas: pré-lavagem, para redução dos resíduos aderidos à superfície dos equipamentos; lavagem com detergentes, sendo utilizados detergentes alcalinos, para remoção de proteínas e gorduras e ácidos para eliminar minerais; enxágue, para remoção dos resíduos e do detergente; e desinfecção (Apolinário, Santos e Lavorato, 2014).

É importante que as práticas de higiene estejam de acordo com o estabelecido no Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos, Portaria nº 368/97 (Brasil, 1997b).

2.3.6. Embalagem, transporte e armazenamento.

Etapas de transporte e acondicionamento devem seguir criteriosamente os princípios de higiene e refrigeração respeitados durante a cadeia de fabricação do queijo, no intuito de preservar a qualidade do produto (CVE, 2008).

A apresentação do queijo Minas Frescal ocorre na forma cilíndrica pesando até 5kg, e deve estar acondicionado em embalagem plástica ou em envases apropriados, mantidos a uma temperatura máxima a 8°C (Mercosul, 1996; Mercosul, 1998).

Queijos maturados como o parmesão, apresentam uma casca dura, que dispensam o uso de embalagem. No entanto, queijos de casca macia faz-se necessária a utilização de uma embalagem protetora (Visotto et al., 2011).

É definido rotulagem: “toda inscrição, legenda, imagem ou toda matéria descritiva ou gráfica, escrita, impressa, estampada, gravada, gravada em relevo ou litografada ou colada sobre a embalagem do produto de origem animal” (Brasil, 2003; Brasil, 2005).

O rótulo dos alimentos auxilia e orienta o consumidor sobre a qualidade e a quantidade dos constituintes nutricionais dos produtos, sendo indispensável a fidedignidade das informações nele contidas (Visotto et al., 2011).

Dentre outras informações, é necessário conter na embalagem a lista de ingredientes, indicação de origem e prazo de validade, estando expresso o dia e o mês para produtos com prazo de validade de até três meses ou o mês e o ano para os produtos com prazo de validade superior a três meses (Brasil, 2003; Brasil, 2005).

Os produtos lácteos e suas indústrias benfeitoras são continuamente fiscalizados no Brasil por órgãos como o MAPA, a ANVISA, e o INMETRO. O DIPOVA (2015) é o principal órgão fiscalizador da indústria e determina se os critérios de fabricação estão sendo precisos. Em caso positivo, a indústria ganha a permissão de colocar na embalagem o carimbo com a sigla SIF, SIM ou SIE (Serviço de Inspeção Federal, Municipal ou Estadual). Sinalizando um produto com certificado de inspeção competente.

No entanto não é possível assegurar que todo o queijo produzido e comercializado seja fiscalizado. Segundo Vinha et al. (2010) queijos inspecionados são principalmente comercializados em mercados, açougues e lojas hortifrutigranjeiros; queijos sem o selo de inspeção estão presentes principalmente em mercados, feira livre e diretamente ao consumidor final.

Em ambientes que manipulam, comercializam, embalam ou armazenam produtos de origem animal, para impedir variações indevidas do produto durante o varejo, é imprescindível a presença de um responsável técnico. De acordo com o determinado em 1968 pela lei 5517, tornou-se de competência exclusiva do médico veterinário a inspeção e a fiscalização sanitária, higiênica e tecnológica em locais de manipulação de produtos de origem animal, incluindo fábricas de laticínios. No entanto a lei somente parece estar aplicada a grandes redes de supermercados (Brasil, 1968).

Sendo assim, ambientes que podem oferecer maior risco ao consumidor são justamente aqueles como mercados, feiras e direto do produtor, pois os mesmos tem maior incidência de alimento não fiscalizado e falta de acompanhamento profissional especializado sobre a conservação e manipulação do queijo (Brasil, 1968; Vinha et al., 2010).

2.4. Microrganismos

Fatores como a temperatura, o pH, disponibilidade de oxigênio, nutrientes e água são de extrema importância para o desenvolvimento e o metabolismo microbiano. Os derivados lácteos, principalmente os queijos, consistem em um meio propício à sobrevivência dos microrganismos, dessa forma são considerados veículos comuns de agentes patogênicos (Visotto et al., 2011).

Queijos frescos e macios, como o queijo Minas Frescal, fornecem excelentes condições para o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e potencialmente patogênicas, e têm sido frequentemente envolvidos em diversos surtos alimentares ocorridos mundialmente, dessa forma podem representar um risco à saúde pública (Visotto et al., 2011, Nunes, Mota e Caldas, 2013).

Dentre os microrganismos envolvidos com os derivados do leite, podem ser classificados três grupos (Paula, Carvalho e Furtado, 2009; Apolinário, Santos e Lavorato, 2014):

- Benéficos à indústria: são necessários para as fermentações, coagulação e demais características organolépticas vantajosas para produto;

- Prejudiciais à indústria (deteriorantes): geram transformações indesejadas com degradação dos nutrientes nos processos tecnológicos
- Patógenos: podem originar doenças em animais e humanos.

Parâmetros	Classificação	
	Queijo Semi-Gordo Alta umidade	Queijo Semi-Gordo Muito Alta umidade
Umidade (g/100g)	46,0 a 54,9	Maior ou igual a 55,0
Gordura (g/100g)	25,0 a 44,9	25 a 44,9
Lista de ingredientes (presença de ácido láctico)	Não permitido	Permitido
Coliformes 45°C	$\leq 5 \times 10^3$ NMP/g	Com cultura láctica: $\leq 5 \times 10^3$ NMP/g Sem cultura láctica: $\leq 5 \times 10^2$ NMP/g
Estafilococos coagulase positiva	$\leq 10^3$ UFC/g	Com cultura láctica: $\leq 10^3$ UFC/g Sem cultura láctica: $\leq 5 \times 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25g	Com cultura láctica: Ausência em 25g Sem cultura láctica: Ausência em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25g	Com cultura láctica: Ausência em 25g Sem cultura láctica: Ausência em 25g

Figura 1.4: Padrões legais para queijo Minas Frescal alta umidade e muito alta umidade de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2001; Brasil 2019 a; Brasil 2019 b; Brigido et al., 2004)

Ensaio microbiológico pré-determinado pelo Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano, visam detectar a presença de patógenos. A presença dessas bactérias, acima dos limites tolerados, ressalta uma incorreta manipulação e inadequadas condições higiênico-sanitárias em qualquer etapa de elaboração do produto. São eles: coliformes a 45°C, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* (Estafilococos coagulase positiva) e *Listeria monocytogenes* (Figura 1.4) (Brasil, 2001; Brasil, 2019a; Brasil 2019b).

A bibliografia nacional nos últimos anos revela um quadro desfavorável na qualidade microbiológica desse queijo, demonstrando a ocorrência de elevados

índices de contaminação, além da presença de bactérias patogênicas. Entre as principais são destacadas bactérias presentes na legislação (como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*), mas também se destacam os gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Sangaletti et al., 2009).

2.4.1. Doenças Transmitida por Alimentos (DTA)

Os queijos são alimentos comuns na veiculação de patógenos, e ao longo dos anos, houve consideráveis mudanças referentes às espécies bacterianas envolvidas na segurança alimentar. Antes do século XX, bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Bacillus anthracis* (antraz) e *Streptococcus* (escarlatina) foram as primeiras associadas aos derivados lácteos. Em seguida vieram a *Coxiella burnetii* (Febre Q) e *S. aureus* (intoxicação estafilocócica). Recentemente foram reconhecidas as bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes*, *E. coli* Shiga-toxigênica, *Cronobacter* e *Salmonella* de importância aos laticínios. A compreensão sobre as espécies, metabolismo e fontes ambientais originárias dessas e outras possíveis bactérias contaminantes são fundamentais para direcionar as práticas de higiene no ambiente industrial (Fox, Jiang e Gobius, 2018).

O queijo é o principal alimento lácteo ligado aos surtos de intoxicação por estafilococos, em especial aqueles típicos queijos de leite cru, não pasteurizado, uma vez que o tratamento térmico tem a função de eliminar o *S. aureus* (Fox, Jiang e Gobius, 2018). São alguns exemplos de surtos por derivados lácteos: leite em pó desnatado contaminado, que no Japão que atingiu cerca de 13.420 casos (Asao et

al., 2003); queijo minas frescal e leite cru, que no Brasil, no estado de Minas Gerais, envolveu 378 pessoas (Do Carmo et al., 2002).

2.4.2. *Staphylococcus* spp.

O nome de *Staphylococcus* foi originário do grego (staphyle) que significa cacho de uvas, devido ao seu formato de cocos e arranjo. Trata-se de bactérias gram-positivas, imóveis, não esporulados e anaeróbios facultativos. A maioria dos estafilococos são catalase positiva e apenas algumas são coagulase positiva. São microrganismos oportunistas que apresentam um habitat natural no organismo animal, podendo ser encontrado na mucosa nasal e oral, na pele e no tubo digestivo (Kloss, Schleir e Goirtz 1992; Lima et al., 2015).

O gênero *Staphylococcus* é composto de 32 espécies, sendo possível encontrar em humanos 16 delas, presentes na microbiota da pele e mucosa de mamíferos e aves. Cada espécie deste gênero tem preferência por colonizar um ponto anatômico do hospedeiro. Em humanos as espécies clinicamente mais importantes: *Staphylococcus lugdenensis* e *Staphylococcus aureus*. Em animais as principais são: *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus* (Kloss, Schleir e Goirtz 1992; Olaechea et al., 2010).

Por se tratar de um organismo oportunista, está intimamente relacionado a inúmeras afecções e múltiplas resistências a antibióticos. Mas quando o objeto de estudo é leite e seus derivados, os *Staphylococcus* spp. estão entre os patógenos mais hegemônicos e visados. Isso se deve ao risco para a saúde da população, especialmente crianças e idosos, que são os principais consumidores dos produtos

lácneos, quando expostos ao leite provenientes do animal com mastite (Amaral et al., 2003; De Visscher et al., 2017).

Este gênero é temido em razão da sua capacidade em produzir toxinas termoestáveis e provocar intoxicação alimentar. Estão divididos em dois grupos: coagulase negativo (CNS) e coagulase positivo (CPS). Ambos associados a casos de mastite subclínica bovina em diversificadas regiões do globo (Israel, et al., 2018, Pollitt, et al., 2018).

Os CPS são estudados extensivamente, em especial o *S. aureus*, isto se deve em parte a sua patogenicidade, particularidades de virulência e eminente papel em infecções e surtos. São evidenciados o papel dos fatores de virulência como: coagulase, toxinas alfa, beta, gama e delta, leucocidinas, enterotoxina, produção de biofilme, hemólise, gravidade e persistência da infecção no hospedeiro, transmissibilidade e protocolo/resistência medicamentosa. Alguns membros deste grupo são, além do *S. aureus*, o *S. intermedius* e *S. pseudintermedius* (Zhang e Maddox, 2000; Israel, et al., 2018).

Embora o CNS não tenha o mesmo destaque do anterior, há evidências de que são patógenos dignos de atenção, um dos motivos é a sua presença no ambiente correlacionados ao bovino e o leite (De Visscher et al., 2017). E com o advento da vigilância no controle de qualidade láctea bovina no mundo, passou-se a ter um olhar mais crítico, porém ainda tímido e limitado, frente a presença dos CNS em infecções crônicas como mastite e reconhecimento de importantes elementos de virulência, que incluem toxinas e enzimas, como leucocidina, hemolisina, lecitinases, lipase, proteases e DNase, ainda não completamente elucidados e multirresistência. Alguns

exemplos deste agrupamento são: *Staphylococcus chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* e *S. simulans* (Zhang e Maddox, 2000; Fry et al., 2014)

As infecções por CNS são os isolados mais frequentes em casos de mastite em diferentes países e estão associados com persistência desta infecção em bovinos leiteiros durante todo período lactacional, que cursa com quadros mais brandos que aqueles provocados por *S. aureus*, intensificando a infiltração leucocitária e aumento do estroma do tecido conjuntivo, o que gera um aumento da contagem de células somáticas (CCS), alterações da composição do leite, e perda de cerca de 9% na produção de leite (Zhang e Maddox, 2000; Amaral et al., 2003; Fry et al., 2014; Brito et al., 2017; Israel, et al., 2018).

No entanto o controle da mastite causada por CNS é difícil pela complexidade deste grupo, na qual encontra mais de 15 espécies de estafilococos associados a doença, e ainda há uma limitação das pesquisas brasileiras abordando as espécies de CNS causadoras de mastites. (Acosta et al., 2016)

Um dos fatores de virulência comum à espécie estafilocócicas é a resistência antimicrobiana, contida no plasmídeo (extra-cromossomal) ou no cromossomo bacteriano. A existência de bactérias resistentes preocupa a população, pois estes microrganismos podem ser transmitidos ao homem pela ingestão ou manipulação de alimentos contaminados e podem transferir tais informações de resistência a outras bactérias patogênicas ou não. Dessa forma, manipuladores de alimentos podem funcionar como reservatórios de perigosas estirpes, fazendo-se necessário o severo controle higiênico-sanitário na manipulação com de queijos e outros lácteos, para evitar à sua contaminação por microrganismos (Rapini et al., 2004).

2.4.2.1. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno bacteriano oportunista, com características de coloração Gram positiva, aeróbio facultativo e formato em coco, motilidade negativa, catalase e coagulase positivo. Sua parede celular é resistente à ação da lisozima, mas sensível à lisostafina, encontrado na pele de humanos e animais. É um agente especializado em superar o sistema imunológico do hospedeiro e possuidor de ampla variedade de fatores de virulência. Capaz de provocar uma infinidade de infecções, tanto de procedência comunitárias ou hospitalar, e que no decurso dos tempos configura uma elevação na frequência e na gravidade das doenças (Acosta et al., 2016; Pollitt, et al., 2018).

Foi isolado e identificado primeiramente em 1884 pelo alemão Anton Rosenbach, período no qual estimava-se que uma bacteremia por *S. aureus* possuía uma letalidade acima de 80%. Com o advento do desenvolvimento da penicilina, primeira droga antimicrobiana, essa taxa de mortalidade decaiu. A penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, é uma droga pertencente à família dos beta-lactâmicos, e sua chegada revolucionou a saúde e farmacologia na época. Mas a partir de 1940, começaram a surgir cepas produtoras de penicilinase e, no final desta década, quase 25% das cepas associadas ao ambiente hospitalar apresentavam resistência à penicilina. Com isso buscou-se a preparação de outra fórmula suficiente para superar a competência da penicilina (Oliveira, Borges e Simões, 2018).

Em 1960 foi então desenvolvida a meticilina, usada principalmente como uma alternativa terapêutica aos agentes resistentes a penicilina. Contudo, já em 1961 foram encontradas estirpes resistentes, denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/ oxacilina (MRSA), e em 1990, não apenas, o percentual de

infecções relacionadas ao MRSA, principalmente hospitalar, atingiu quase 30%, como também foram identificados sua presença em indivíduos saudáveis da comunidade, sem exposição hospitalar (Oliveira, Borges e Simões, 2018).

A resistência foi provocada provavelmente pela mobilidade de componentes genéticos compreendidos na transmissão de informações principalmente da resistência medicamentosa, mas conjuntamente também aos variados fatores de virulência e, robustecendo cepas e espécies dissipadas no mundo (Venkatesh, 2018).

Aproximadamente 30% da população humana mundial está assintomaticamente colonizada por *S. aureus* que está situado principalmente nas narinas, mas sua presença, por si só, não está necessariamente vinculada ao hospedeiro, pois é provável encontrá-lo também em superfícies inanimadas, por transferência de contato, na qual tem uma sobrevivência razoável (Venkatesh, 2018).

Embora seu habitat possa ocorrer na pele, a maior ocorrência de enfermidades por *S. aureus* é acometida de forma iatrogênica, e em alguns casos humanos podem estar associadas à colonização de objetos médicos. O processo infeccioso pelo *S. aureus* é complexo e dinâmico, e se origina com uma resposta imune incitada pela imunidade inata, que liberam quimiocinas. Com o avançar da inflamação local pode transcorrer da fibrose, aos abscessos purulentos. Todavia, o agente ainda possui capacidade de escapar das zonas infecciosas, resultando em metástase, disseminando-se para outros tecidos, órgãos e invadindo a corrente sanguínea, provocando um quadro de bacteremia/ sepsis (Pollitt et al., 2018).

Como a bactéria é onipresente no cotidiano do animal e homem, está em constante exposição aos sistemas imunológicos desses organismos. Consequentemente o resultado de anos de exposição renderam múltiplos

mecanismos para ludibriar as células de defesa, aumentando seu potencial patogênico, adaptação ao ambiente, sobrevivência e escape ao sistema imune e mecanismos de resistência às drogas por meio da expressão dos fatores de virulência e toxinas. Razões pela qual essas infecções tornam-se cada vez mais difíceis de tratar e mais letais (Oliveira, Borges e Simões, 2018; Prystopiuk et al., 2018, Pollitt et al., 2018).

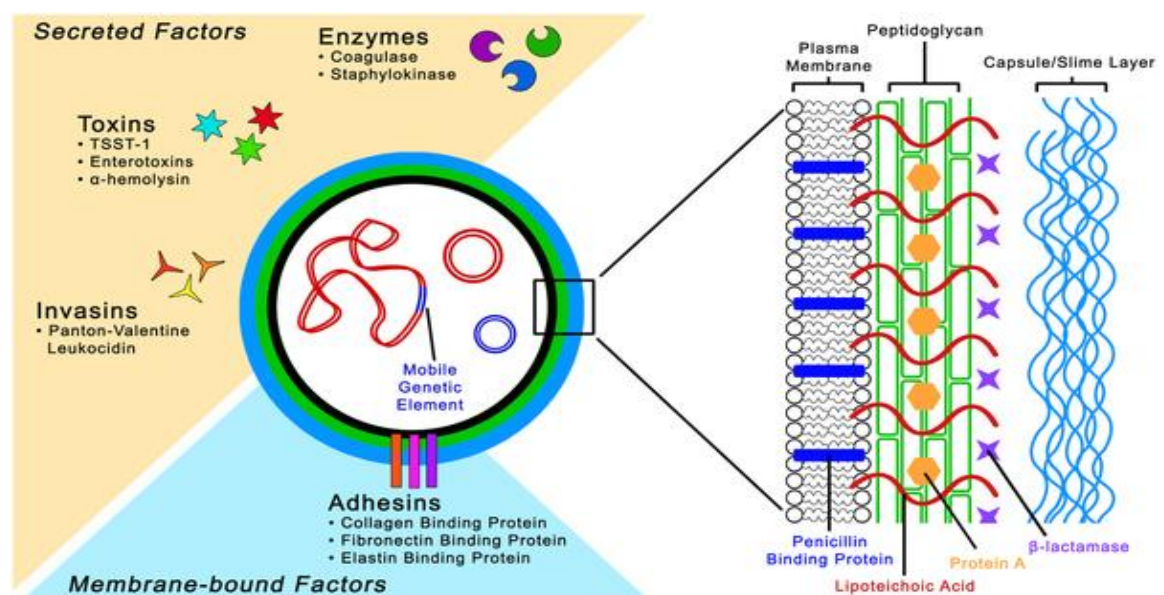


Figura 1.5: Fatores de virulência dos *Staphylococcus aureus* (Kong et al., 2016)

Alguns dos vários fatores que regulam a virulência e patogenicidade do *S. aureus* (Figura 1.5), estão focados nos mecanismos de evasão imune do hospedeiro, e visam inibir eficazmente a resposta humoral (linfócitos B) e celular (linfócitos T). São aqueles responsáveis pela inatividade de anticorpos (SpA, Sbi, CP5 e CP8), interferência sobre proteínas e quimiotaxia de fagócitos (SCIN e FLIPr), e síntese de citotoxinas específicas para fagócitos (hemolisinas e leucocidinas) (Prystopiuk et al., 2018, Pollitt et al., 2018).

Outro mecanismo efetivo é a capacidade de invadir células do hospedeiro, como osteoblastos, endotélio e epitélio. A internalização ocorre por ativação de diferentes

proteínas de superfície para adesão, chamadas de adesinas. Sua função é interagir com a matriz extracelular, como plasma sanguíneo e superfície celular, permitindo que *S. aureus* adira firmemente, deforme a membrana plasmática e seja endocitado. Uma vez que o patógeno seja internalizado nas células, representa um reservatório protetor de drogas e do sistema imune, ao evitar a fagocitose (Prystopiuk et al., 2018, Pollitt et al., 2018).

2.4.2.1.1 Coagulase

Os *Staphylococcus aureus* se destacam pelo seu elevado potencial patogênico, consequência de sua propensão evolutiva particular, por múltiplos mecanismos adaptativos. Um exemplo é a capacidade de explorar o maquinário do hospedeiro para construir um escudo a sua volta. É a forma que *S. aureus* usa para sobreviver no sangue humano, pela produção de coagulase (COA). No laboratório clínico, a enzima coagulase é um recurso fenotípico amplamente aplicado, uma técnica simples e precisa no diagnóstico desse agente. Sendo assim a capacidade de coagular o plasma é usada para diferenciar entre isolados de estafilococos coagulase-positivos (CPS) (*S. aureus*) e os negativos (CNS) (Zapotoczna, O'Neill e O'gara, 2016; Mahmoudi et al., 2017; Oliveira, Borges e Simões, 2018).

A coagulase é o agente motivador para a cascata de coagulação do plasma interagindo com a protrombina e o fibrinogênio até a formação da fibrina, semelhante ao fator von Willebrand (vWbp). Enquanto o fator de aglomeração (ClfA) contribui para a agregação plaquetária por meio de um mecanismo dependente de outros componentes plasmáticos como sistema complemento e fibrinogênio. Sua presença contribui para a formação de abscessos, formação do biofilme, e confere ao patógeno

formação do VWF (fator de von Willebrand) e interação com a fibronectina e o fator XIII (Figura 1.6) (Singh e Phukan, 2019).

O gene COA apresenta um domínio heterogêneo, com base em suas características polimórficas, ocasionando em variabilidade genética favorável. As ocorrências diversificadas na sequência de DNA ocorrem na região variável 3', por repetições de segmentos ou mudança pontuais de aminoácidos, resultado de mutações evolutivas (Mahmoudi et al., 2017).

Dessa forma, as espécies *Staphylococcus* coagulase positivas se destacam na presença desse gene com variados tamanhos moleculares e nas propriedades antigênicas da enzima coagulase (Somphol et al., 2018). Essa heterogeneidade característica do gene, confere um recurso de escape do sistema imune, favorecendo a patogenia da doença (Reinoso et al., 2008).

3.4.2.1.2. Biofilme

Os biofilmes são descritos como aglomerações celulares associadas a uma matriz extracelular heterogênea diversa, com características fisiológicas específicas. À medida que o biofilme vai amadurecendo e acumulando mais componentes se transformam em estruturas tridimensionais. Sua função básica é blindar as bactérias contra fagocitose e antimicrobianos. A causa mais frequente de infecções pelo gênero *Staphylococcus* está associada a formação do biofilme, entre as espécies mais envolvidas estão *S. epidermidis* e *S. aureus*, que não medem esforços para se fixar as superfícies por diversos mecanismos de adesão (Zapotoczna, O'Neill e O'gara, 2016; Israel et al., 2018).

Essas bactérias podem adotar vários genes e Mecanismos para formação de diferentes tipos de biofilmes, e dificilmente utilizará mais de um tipo de proteção desnecessariamente. A escolha do Mecanismo desencadeante dependerá do ambiente e tipo de nutrientes disponíveis. Alguns biofilmes são formados por: polissacarídeo (icaADBC) e é comum em isolados de *S. aureus* sensíveis à metilicina; proteínas de superfície (FnBPs e SasG / Aap) podendo ser utilizados restos celulares; fibrina (COA e vWbp) que pode ser disperso pela plasmina produzida após a ativação do plasminogênio mediada por estafilocinase; e amiloide por meio dos módulos solúveis em fenol (Figura 1.7)(Zapotoczna, O'neill e O'gara, 2016).

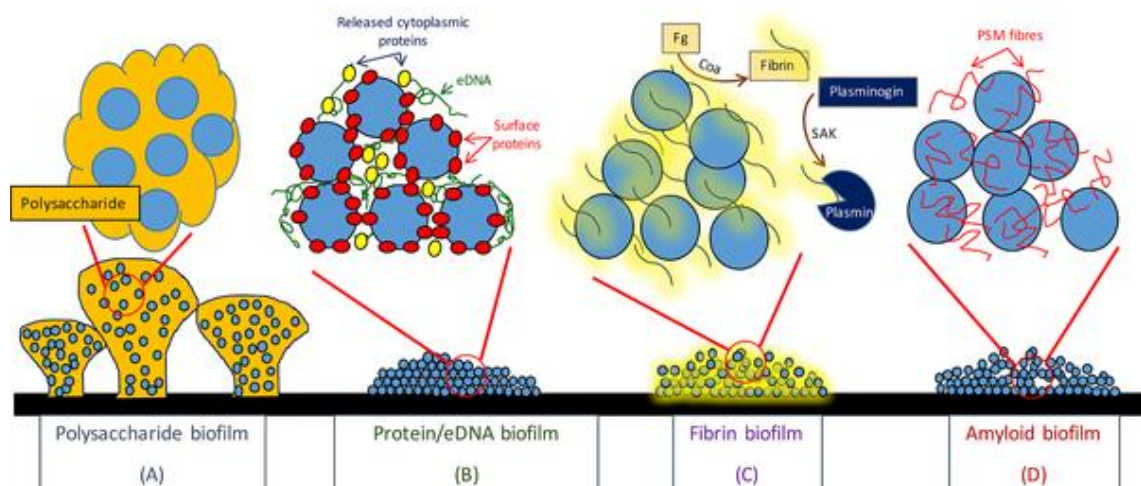


Figura 1.7: tipos de biofilmes formados pelos *Staphylococcus aureus* (Zapotoczna, O'neill e O'gara, 2016)

A presença da coagulase desempenha um papel crítico para formação do biofilme de fibrina para adesão, escape do sistema imune e formação do abscesso. Inicialmente seu emprego é explorado para uma colonização imediata e após a sua maturação, torna-se o biofilme que exibe maior resistência a drogas antimicrobianas,

serve de escudo protegendo *S. aureus* do encontro com as células fagocíticas, aumentando sua sobrevivência no ambiente infeccionado e facilitando a disseminação da patogênese na corrente sanguínea (Zapotoczna, O'Neill e O'gara, 2016; Singh e Phukan, 2019).

2.4.2.1.3 Toxinas

Alguns dos muitos fatores de virulência produzidos por *S. aureus* podem ser denominados como toxinas, pois geralmente são descritos como substâncias secretadas pelo microrganismo e perturba diretamente o hospedeiro. As principais toxinas de *S. aureus* podem ser divididas em três classes: as toxinas formadoras de poros (TFP), as toxinas esfoliativas (ETs) e os superantígenos (SAg). Essas toxinas são qualificadas para desarranjar as membranas plasmáticas, degradar as conexões intercelulares teciduais e modular o sistema imunes, respectivamente (Oliveira, Borges e Simões, 2018, Pereira et al 2018).

A classe dos Superantígenos (SAg) eram denominados anteriormente por enterotoxinas estafilocócicas (SE), pois antigamente conheciam-se apenas aquelas toxinas capazes de induzir sinais clínicos de vômito e diarreia, semelhante a intoxicação alimentar, mas atualmente foram identificadas outras toxinas sem características de doença do trato gastrointestinal. São conhecidas mais de 23 toxinas estafilocócicas de SAg, são elas: a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), e as enterotoxinas estafilocócicas (SE) (SEA para SEE, SEG para SEJ, SEL para SEQ e SER para SET) e 11 semelhantes a superantígenos estafilocócicos (SSL) (SEIK para SEIQ, SEIU para SEIX) (Oliveira, Borges e Simões, 2018).

O Mecanismo de ação das SAg foi caracterizado no ano de 1988, pela primeira vez, por Bernhard Fleischer e Hubert Schrezenmeier. Foi compreendido que SAg ativam simultaneamente um expressivo número de linfócitos T. Sua forma de ação afeta regiões conservadas do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC II), moléculas presentes em células apresentadoras de antígenos aos linfócitos CD 4 (auxiliadores), seu desfecho resulta numa desregulação da resposta de um grande número de células T auxiliares aos SAg. Inicialmente provoca elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ e TNF), o que resulta nos sinais clínicos de febre, erupção cutânea e descamação, distúrbios digestivos, hipotensão arterial até falência múltipla dos órgãos. E por fim não há expansão clonal e sim uma indução a apoptose celular, neutralizando a resposta de anticorpos (Oliveira, Borges e Simões, 2018).

Contudo, nem todos os isolados de *S. aureus* apresentam em seu DNA os genes da classe dos SAg. A produção da toxina está restrita àqueles agentes dotados dos genes e em presença de um ambiente com condições apropriadas para o crescimento. Com o acúmulo da SE presentes no alimento pode provocar a intoxicação alimentar estafilocócica, quase 95,0% dos surtos causados por intoxicação alimentar estafilocócica no mundo são provocadas pelas toxinas clássicas, responsáveis pela produção de resposta emética/ diarreica são: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (Pereira et al., 2018).

Casos de averiguação de surto com suspeita de intoxicação por *Staphylococcus* pode ser difícil a identificação do agente, já que as toxinas são pré-formadas durante o crescimento de *S. aureus* nos alimentos e são resistentes ao calor. Dessa forma não podem ser inativadas de maneira confiável pelo processamento de alimentos ou tratamento térmico, por exemplo. As toxinas formadas pelo *S. aureus* permanecem

estáveis capazes de causarem desordens clínicas em pessoas e animais (Johler et al., 2015; Schelin, Susilo e Johler, 2017).

Tem-se focado principalmente na detecção direta da toxina à contagem de unidades formadoras de colônias de *S. aureus* presentes nos alimentos. Da mesma forma que a prevenção é inibir o crescimento inicial das cepas do agente, evitando o acúmulo e produção das toxinas indesejáveis, para minimizar o risco de intoxicação (Johler et al., 2015; Schelin, Susilo e Johler, 2017).

O curso da doença provocada pelas enterotoxinas é rápido e os sinais desaparecem em 24h. O quadro clínico inicia logo após a ingestão, que são náuseas e vômitos violentos, geralmente acompanhados de diarreia aquosa, prostração e febre, mas podem ser fatais em crianças e idosos, com uma taxa de mortalidade de 4,4% (Schelin, Susilo e Johler, 2017).

São inúmeros os dados dos surtos por SA_g. Como os dados norte-americanos que estimam anualmente 240 mil casos por intoxicações estafilocócicas (Schelin, Susilo e Johler, 2017). Os surtos estão espalhados por todos os continentes, e maioria tem correlação com produtos lácteos, mas foram identificados diferentes genes das toxinas, por exemplo na Suíça com presença de SEA e SED (Johler, 2015), na Itália com SEC e TSST (Vitale et al., 2014), no Japão com SEA (Asao et al., 2003) e no Brasil com SEA, SEB e SEC (Do Carmo et al., 2002).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PRYSTOPIUK, V.; FEUILLIE, C.; HERMAN-BAUSIER, P.; VIELA, F.; ALSTEENS, D.; PIETROCOLA, G.; DUFRÊNE, Y. F. Mechanical forces guiding *Staphylococcus aureus* cellular invasion. **ACS nano**, v. 12, n. 4, p. 3609-3622, 2018.

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G. D.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.

AMARAL, L. A., ROSSI JUNIOR, O. D., NADER FILHO, A., FERREIRA, F. L. A., & BARROS, L. S. S. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 620-623, 2003.

APOLINÁRIO, T.C.C.; SANTOS, G.S.; LAVORATO, J.A.A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and infection**, v. 130, n. 1, p. 33, 2003.

BEZERRA, A. V. A.; dos REIS, E. M.; RODRIGUES, R. O.; CENCI, A.; CERVA, C.; MAYER, F. Q. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Complexes by real-time PCR in bovine milk from Brazilian dairy farms. **Journal of food protection**, v. 78, n. 5, p. 1037-1042, 2015.

BRASIL, DATASUS Trata Brasil e CEBDS destacam benefícios com expansão do saneamento, Departamento de Informática do SUS - Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Decreto-Lei Nº 923/1969. Dispõe sobre a comercialização do leite, 1969.

BRASIL, Instrução Normativa nº 62/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, 2011.

BRASIL, Instrução Normativa nº 22/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento., de 24 de novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado. 2005.

BRASIL, Lei nº 5.517/1968, Dispõe sobre o exercício da profissão de médico-veterinário e cria os Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária. 1968.

BRASIL, Portaria nº 146/1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da reforma agrária. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos, 1996.

BRASIL, Portaria nº 352/1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, 1997a.

BRASIL, Portaria nº 368/1997 do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos elaboradores/ Industrializadores de Alimentos. 1997b.

BRASIL, Resolução RDC nº 12/2001 da Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

BRASIL, Resolução RDC nº 359/2003 do Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. 2003.

BRASIL. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Edição 249, Seção 1, p.133. 2019 b.

BRASIL. Resolução RDC nº 331/ 2019 do Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Edição 249, Seção 1, p. 96. 2019 a.

BRITO, A. F.; SODER, K. J.; CHOUINARD, P. Y.; REIS, S. F.; ROSS, S.; RUBANO, M. D.; CASLER, M. D. Production performance and milk fatty acid profile in grazing dairy cows offered ground corn or liquid molasses as the sole supplemental nonstructural carbohydrate source. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 10, p. 8146-8160, 2017.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262-267. 2007.

CARVALHO, M.P.; VENTURINI, C.E.P.; GALAN, V.B. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil, 2015 Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>

CDC (Center for Diseases Control-US), 2003 Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1993-1997. 2003.

CHALITA, M.A.N. O consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto, **Revista de Economia e Sociologia Rural** v.50, n.3. 2012.

COBO-ANGEL, C. G.; JARAMILLO-JARAMILLO, A. S.; PALACIO-AGUILERA, M.; JURADO-VARGAS, L.; CALVO-VILLEGAS, E. A.; OSPINA-LOAIZA, D. A.; CEBALLOS-MARQUEZ, A. Potential group B *Streptococcus interspecies* transmission between cattle and people in Colombian dairy farms. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

CODEPLAN, C. D. P. D. D. (2019). Federal. 2019. Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílio (PDAD)–2018, Distrito Federal. Disponível em: http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2019/03/PDAD_DF-Grupo-de-Renda-compactado.pdf

CVE (Centro De Vigilância Epidemiológica). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por água e alimentos. **Centro de vigilância epidemiológica**. São Paulo, 2008.

DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; HAESEBROUCK, F.; SUPRÉ, K.; DE VLIEGHER, S. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: prevalence, distribution, and associated subgroup-and species-specific risk factors. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 1, p. 629-642, 2017.

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

EFSA (The European Food Safety Authority). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. **EFSA Journal**, v.13, p.3940, 2015.

EMBRAPA. Ainfo - Anuário do Leite 2019. Disponível em: [ainfo.cnptia.embrapa.br > bitstream > item > Anuario-LEITE-2019](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/bitstream/item/Anuario-LEITE-2019)

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization) The State of Food Security and Nutrition in the World 2017, Rome, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-l7695e.pdf>
FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 313p.

FOX, E. M.; JIANG, Y.; GOBIUS, K. S. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. **International Dairy Journal**, v.84, p.28-35, 2018.

FRY, P. R.; MIDDLETON, J. R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk

somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 8, p. 4876-4885, 2014.

GARCIA, D.P.; DUARTE, D.A. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.6, n.1, 545-554. 2014.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2011.

HUANG, F.; LI, Y.; YU, W.; JING, S.; WANG, J.; LONG, F.; LIU, C. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. **Hepatology**, v. 64, n. 2, p. 350-359, 2016.

ISRAEL, L. F. S.; RABELLO, R. F.; DOMINGOS, S. C. B.; MEDEIROS, L. S. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1943-1949, 2018.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUGUENIN, M. C.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 5, p. 2944-2948, 2015.

KLOSS, W.E.; SCHLEIR, K.H.; GOIRTZ, F. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. **The Prokaryotes**, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992.

KO, Y. P.; KANG, M.; GANESH, V. K.; RAVIRAJAN, D.; LI, B.; HÖÖK, M. Coagulase and Efb of *Staphylococcus aureus* have a common fibrinogen binding motif. **MBio**, v. 7, n. 1, p. e01885-15, 2016.

KONG, E.F.; JOHNSON, J.K.; JABRA-RIZK, M.A. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 10, 2016.

LANGE, M. J.; ZAMBOM, M. A.; POZZA, M. S.; SIMÕES, G. H.; FERNANDES, T.; TININI, R. C.; ANSCHAU, F. A. Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1205-1212, 2017.

LIMA, M.F.P.; BORGES, M.A.; PARENTE, R.S.; JÚNIOR, R.C.V.; OLIVEIRA, M.E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **Revista Uningá Review**, v.21,n.1,p.32-39, 2015.

MAHMOUDI, H.; ARABESTANI, M. R.; MOUSAVI, S. F.; ALIKHANI, M. Y. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 8, p. 41-45, 2017.

MALACHOWA, N.; KOBAYASHI, S. D.; PORTER, A. R.; BRAUGHTON, K. R.; SCOTT, D. P.; GARDNER, D. J.; DELEO, F. R. Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. **PloS one**, v. 11, n. 6, 2016.

MERCOSUL. Resolução GMC nº145/96, Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, 1996.

MERCOSUL. Resolução GMC nº44/98, Correção da Resolução GMC N° 145/96 Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, 1998.

MONTEIRO, R. P.; CHAVES, ACSD. Tradição e contradição: queijo Minas artesanal, patrimônio histórico, legislação e pesquisa. **Embrapa Agroindústria de Alimentos- Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

NUNES, M.M.; MOTA, A.L.A.A.; CALDAS, E.D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, **Brazil Food Control**, v.34, p.235-240, 2013.

OECD/ FAO (Organisation for Economic Co-operation and Development/ Food and Agriculture Organization of the United Nations) Agricultural Outlook 2018-2027, Chapter 1, 2018. Disponível em:
http://www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e_Chapter1.pdf

OLAECHEA, P.M.; INSAUSTI, J.; BLANCO, A.; LUQUE, P. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. **Medicina Intensiva**, v.34, p. 256-267. 2010.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE), 1995. Emerging and other communicable diseases, surveillance and control: Report of a WHO consultation of public health implications of consumption of raw milk and meat and their products, p.17-20, 1995.

PAULA, J.C.J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 367/368, v. 64, p.19-25, 2009.

PEREIRA, C. T. M.; DE OLIVEIRA, D. S. V.; VELOSO, V. S.; SILVA, S. D. S. P.; SANTOS, L. S.; LIMA, A. F.; DOS SANTOS SOARES, M. J. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 1957-1968, 2018.

PEREIRA, J.B.F. Partição de cálcio em queijo minas padrão e sua bioacessibilidade ao longo do tempo de maturação. Universidade Federal de Juiz de Fora – Programa de Pós-graduação em ciências e tecnologia do leite e derivados. Juiz de Fora, 2014.

POLLITT, E. J.; SZKUTA, P. T.; BURNS, N.; FOSTER, S. J. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007112, 2018.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 314-322, 2008.

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, 2009.

ROCHA, A.A. Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros, ABIQ, 2014. Disponível em:
<http://www.abiq.com.br/imprensa/namidia/Valor%20Economico%20%20Fabio%20Scarcelli%20%20Mercado%20de%20queijos%20cresce%20no%20pa%C3%ADs%20e%20atrai%20estrangeiros.pdf>

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

SARFRAZ, M.; ASHRAF, Y.; ASHRAF, S. A Review: Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria* species in milk products. **Matrix Science Medica**, v. 1, n. 1, p. 03-09, 2017.

SCHELIN, J.; SUSILO, Y. B.; JOHLER, S. Expression of staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 401, 2017.

SCHMIDT, T.; KOCK, M.M.; EHLERS, M. M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 511, 2017.

SILVA, J.; MORAES, C. M. D.; SILVA, C. L.; SALES, G. A.; KEID, L. B.; MATOS, P.; MORAES, C. C. *Brucella abortus* em queijos na região amazônica: diferenciação em cepa vacinal (B19) ou de infecção a campo nos estados do Pará, Amapá e Rondônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 705-710, 2016.

SINGH, V.; PHUKAN, U. J. Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-system regulates virulence and pathogenicity. **Medical microbiology and immunology**, p. 1-23, 2018.

SOMPOL, N.; THAMRONGYOSWITTAYAKUL, C.; WILAILUCKANA, C.; PHUEKTES, P.; YEANPET, C. Prevalence and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk in Mastitic Dairy Cows Based on Conventional and Multiplex PCR Assays in Khon Kaen Province, Thailand. **Pawarun Agriculture Journal**, v. 15, n.1, p. 278-288, 2018.

SORIO, A. Cadeia agroindustrial do leite no Brasil - diagnóstico dos fatores limitantes à competitividade. 2018 Disponível em: http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Brasilia/pdf/brz_sc_cadeia_produtiva_leite_MICS_por_2018.pdf

SPINKS, R. Surprise, the country that consumes the most cheese is not France, **Quartz**, 2018. Disponível em: <https://qz.com/quartz/1220074/the-countries-that-love-and-hate-cheese-the-most/>

VENKATESH, V. *Staphylococcus aureus* and MRSA: Do we know the true burden? **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 3, p. 103-104, 2018.

VINHA, M.B.A; PINTO, C.L.O.; SOUZA, M.R.M. CHAVES, J.B.P. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 2023-2029, 2010.

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, 2011.

VITALE, M.; SCATASSA, M. L.; CARDAMONE, C.; OLIVERI, G.; PIRAINO, C.; ALDUINA, R.; NAPOLI, C. Staphylococcal food poisoning case and molecular analysis of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food in Sicily, Italy. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 1, p. 21-23, 2015.

ZAPOTOCZNA, M.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, 2016.

ZHANG, S.; MADDOX, C. W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 3, p. 1102-1108, 2000.

CAPÍTULO II

OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL(DF), BRASIL.

Occurrence of *Staphylococcus* spp. isolates from minas fresh cheese commercialized at the Federal District (FD), Brazil.

RESUMO

O queijo tipo minas frescal é um dos alimentos de origem láctea mais consumidos no Brasil, mas também é o principal envolvido em surtos de intoxicação alimentar, na qual o principal agente envolvido são as espécies de *Staphylococcus*. O estudo realizado teve como objetivo investigar a presença do gênero *Staphylococcus*, e particularmente das estirpes de *S. aureus*, a identificação de estirpes enterotóxicas e MRSA (MecA), e sua resistência aos antimicrobianos, na matriz queijo tipo minas frescal comercializados no Distrito Federal. Foi realizado um estudo epidemiológico observacional, transversal, descritivo e exploratório, no qual foram coletadas amostras de queijos tipo minas frescal fracionados em diferentes pontos de vendas, distribuídos em 6 Unidades de Planejamento Territorial (UPT) Norte, Sul, Central, Central adjacente, Leste e Oeste. As amostras foram isoladas em Baird Parker e identificadas a partir dos testes bioquímicos. Estirpes caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positiva seguiram para análise por PCR com oligonucleotídeos: espécie-específico AroA, enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SEE, e resistência MecA e antibiograma. Dentre o grupo amostral de 134 queijos coletados, 54 amostras foram detectadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positivas, e após PCR do gene AroA espécie específico foram identificados 38 isolados de *S. aureus*. O queijo com maior contaminação por *Staphylococcus* spp. ($5,8 \times 10^{11}$ UFC/g) foi oriundo do mercado informal de Ceilândia (Oeste). De forma geral, as maiores médias de contaminação foram $2,8 \times 10^{10}$ UFC/g, para a região foi a Oeste, e $1,4 \times 10^{10}$ UFC/g para o mercado informal. Foram encontradas 9 isolados de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, os quais apresentaram PCR positivos para 10 genes: SEA (6/38), SEC (2/38) e SEE (2/38), não foi encontrado a toxina B (SEB) nas cepas estudadas. Foi encontrado um

predomínio de cepas enterotoxigênicas no Guará (Central Adjacente) (4/10) e no ponto de venda informal (7/10). Um isolado de *S. aureus* do estudo foi identificado o gene MECA (MRSA), originária do queijo de São Sebastião (Leste) comercializado em uma casa de frios. 36/38 *S.aureus* apresentaram resistência a droga ceftazidima. A região Central Adjacente e Oeste do DF se sobressaíram pela alta contaminação estafilocócica, presença de *S. aureus* e toxinas, principalmente no mercado informal, e sugere intervenções direcionadas para o controle dos *Staphylococcus* spp., preferencialmente nos pontos de venda.

Palavras chave: Enterotoxinas. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA). Patógeno de origem alimentar. Microbiologia de alimentos. Derivado lácteo.

ABSTRACT

The Minas-type fresh cheese is one of the most consumed dairy products in Brazil, and it is the main one involved in food poisoning outbreaks, in which the major involved agent are the *Staphylococcus* species. The aim of this study was to investigate the presence of the *Staphylococcus* genus, and particularly the *S. aureus* strains, the identification of enterotoxigenic and MRSA strains (MecA), and their antimicrobials resistance in the Minas-type fresh cheese matrix marketed in the Federal District. An observational, cross-sectional, descriptive and exploratory epidemiological study was carried out, in which samples of fractional Minas fresh cheese were collected at different points of sale, distributed in 6 Territorial Planning Units (UPT) North, South, Central, Adjacent Central, East and West. The samples were isolated using Baird Parker and identified by biochemical tests. The strains characterized as coagulase positive *Staphylococcus* were further analysed by PCR, with oligonucleotides: species-specific AroA, SEA, SEB, SEC and SEE enterotoxins, and MecA resistance and antibiogram. Within the sample group with 134 cheeses collected, 54 samples had the presence of coagulase positive *Staphylococcus* detected, and after PCR of the specific species AroA gene, 38 *S. aureus* isolates were identified. The cheese with the highest *Staphylococcus* spp. contamination (5.8×10^{11} UFC/g) came from the informal market in Ceilândia (West). In general, the highest contamination averages were 2.8×10^{10} UFC/g, for the West region, and 1.4×10^{10} UFC/g for the informal market. Nine isolates of enterotoxigenic *Staphylococcus* were found, which showed positive PCR for 10 genes: SEA (6/38), SEC (2/38) and SEE (2/38), toxin B (SEB) was not found in the studied strains. A predominance of enterotoxigenic strains was found in Guará (Central Adjacent) (4/10) and at the informal point of sale (7/10). The MecA gene (MRSA) was identified in an *S. aureus* isolate, originated from São Sebastião cheese (East) which was sold in a cheese shop. 36/38 *S.aureus* showed drug resistance to the ceftazidime. The Central Adjacent and West regions of the Federal District were highlighted due to the high staphylococcal contamination and the presence of *S. aureus* and toxins, mainly in the informal market, which suggests that interventions aiming at controlling *Staphylococcus* spp., preferably at points of sale, are necessary.

Keywords: Enterotoxins. *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (MRSA). Foodborne pathogen. Food microbiology. Dairy.

1. INTRODUÇÃO

O queijo minas frescal é o derivado lácteo mais popular entre os queijos consumidos e difundido por todas as classes da população brasileira (Carvalho *et al.*, 2007). Mas por se tratar de um queijo de massa crua e com elevada umidade, é muito perecível, o que em certas situações pode ser agravado com a má qualidade do leite (Mercosul, 1996; Mercosul, 1998; Nunes *et al.*, 2013).

Os estafilococos apresentam um papel importante na questão que envolve saúde pública, pois além de estarem amplamente disseminados no ambiente e na pele do homem e animais, são frequentemente encontrados em leite e derivados (Cunha Neto *et al.*, 2002; García-Álvarez *et al.*, 2011). Sua capacidade produtora de enterotoxina termoestável o torna responsável por toxinfecções alimentares, e devido a habilidade no desenvolvimento de resistência a drogas com repasse a outros gêneros, apresentam potencial risco a população (Cervantes-García *et al.*, 2014; Cousin *et al.*, 2018).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais frequentes (Ferreira *et al.*, 2016). Ocorre devido ao consumo de alimentos contaminados por toxinas, especialmente as SEA, SEB, SEC, SED, SEE, que são produzidas sobretudo pela espécie *S. aureus*, podendo ocasionar mortalidade em indivíduos debilitados (CDC 2003; Garcia *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2016).

O alimento mais descrito nos surtos de intoxicação alimentar é o queijo, pois é um alimento sensível a contaminações (Pereira *et al.*, 2018). E quando se trata de

queijo tipo minas frescal, o *S. aureus* é o principal responsável por essas contaminações (Ferreira *et al.*, 2016). A origem dos xenobióticos (patógenos e toxinas) pode estar originalmente na matéria prima ou terem sido veiculados, de alguma forma, desde a fabricação até a distribuição (Rocha *et al.*, 2006).

Entre os anos de 2000 a 2017, no Brasil foram notificados 12.503 surtos de intoxicação alimentar e 182 óbitos, na qual em 92,2% desses casos foram identificadas as bactérias como agentes intoxicadores. Dentre as bactérias isoladas, o terceiro principal agente envolvido foram os *S. aureus*, identificado em mais de 15% dos surtos de DTA, e os alimentos derivados de leite são um dos principais alimentos incriminados como veiculadores. Sendo o local primordial de acometimento dos quadros de intoxicação ocorrem na residência (38,9%) dos afetados (Brasil, 2018).

O estudo explora uma análise da qualidade dos queijos disponíveis ao consumidor, na região do DF. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Staphylococcus* spp., identificar *S. aureus* e sua análise molecular para a detecção de genes de toxinas, MRSA (MecA), e sua resistência aos antimicrobianos, em queijos minas frescal comercializados em empreendimentos formais e informais na região do Distrito Federal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras:

Foi realizado um estudo epidemiológico observacional, transversal, descritivo e exploratório. O objeto de estudo foi o queijo minas frescal, fracionado, coletado de forma aleatória, disponível à população de maneira geral, em ambientes comercializadores de queijos, divididos em grupos de acordo com sua origem do varejo: casas de frios, hortifrutis, mercados/mercearias, padarias, supermercados e um grupo que foi denominado como “comércio informal” (oriundos de feiras permanentes, feiras itinerantes e ambulantes/autônomos). Os queijos coletados tinham características de serem tanto inspecionados ou não, refrigerados ou não e artesanais ou industrializados, buscando simular a realidade do consumidor.

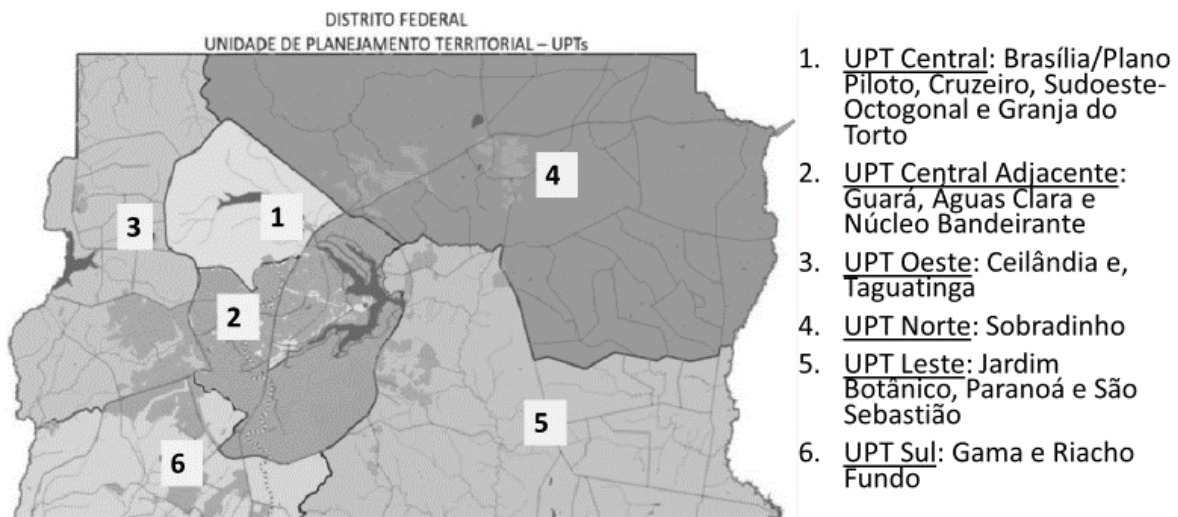


Figura2.1: Esquema geográfico das Unidades de Planejamento e Regiões Administrativas onde foram coletadas as amostras de queijos minas frescal (CODEPLAN, 2017).

Ao total foram 134 unidades de queijo tipo Minas Frescal fracionado, transportados em caixa isotérmica, sob a temperatura de 7°C, coletadas no ano de 2015. Recolhidos de 15 regiões administrativas (RA) do Distrito Federal agrupado, de acordo com a CODEPLAN, em 6 Unidade de planejamento territorial (UPT) listados na figura 2.1 (CODEPLAN, 2017; CODEPLAN, 2019).

2.2. Isolamento microbiológico:

Uma alíquota de 10g cada amostra de queijos foi diluída e homogeneizada em 90 mL de solução salina 0,1%, como determinado por Brasil (2001). Foi inoculado 0,1 mL de cada diluição e distribuído na superfície do ágar Baird-Parker (BPK) (Difco, Sparks ®), preparado conforme as instruções do fabricante, em placa de petri, e incubadas à temperatura $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após este período, foi realizada a leitura da placa, contabilizada com o auxílio de um contador de colônias, sendo os resultados de contagem expresso em UFC/g, considerando-se a diluição empregada.

As colônias com características típicas de *Staphylococcus* sp., cultivadas em BPK, foram selecionadas para serem transferidas ao caldo enriquecido Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Sparks ®) incubados à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas, e reincubadas em placas de petri contendo ágar acrescido de sangue de ovino desfibrilado 5% (Acumedia®) a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. As placas que apresentaram alguma contaminação, foram submetidas a um novo repique e as demais seguiram para determinação bioquímica (Quinn *et al.*, 1994).

2.3. Identificação bioquímica:

A partir das colônias reincubadas em ágar sangue, com características *Staphylococcus* sp., foi realizada coloração de Gram, e testes de coagulase, oxidase, catalase, fermentação do ágar sal manitol e VP (Voges Proskauer) (Brasil, 2003, Quinn *et al.*, 1994).

2.3.1. Extração do DNA total e identificação dos genes de virulência, MRSA e espécie-específico por PCR dos *Staphylococcus* coagulase positiva

Os isolados de *S. aureus* foram extraídos utilizando o método por fenol-clorofórmio (Sigma-Aldrich®) seguindo o método de Sambrook *et al.* (1989).

Quadro 2.1: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para PCR, espécie específicos, resistência e enterotoxinas para *S. aureus*.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento	Autores
ARO A-1	AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC	1153 pb	Marcos et al., (1999)
ARO A-2	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	1153 pb	Marcos et al., (1999)
SEA-1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120 pb	Medeiros et al., (2013)
SEA-2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	120 pb	Medeiros et al., (2013)
SEB-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478 pb	Medeiros et al., (2013)
SEB-2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	478 pb	Medeiros et al., (2013)
SEC-1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257 pb	Medeiros et al., (2013)
SEC-2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	257 pb	Medeiros et al., (2013)
SEE-1	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	170 pb	Mclauchlin et al., (2000)
SEE-2	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	170 pb	Mclauchlin et al., (2000)
MECA-1	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310 pb	Jonas et al., (2002)
MECA-2	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310 pb	Jonas et al., (2002)

(AroA: gene espécie-específico, SEA/SEB/SEC/SEE: genes de enterotoxinas A, B, C e E, MecA: gene de resistência a metilina)

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 4µl do DNA extraído; 5µl de solução tampão (5X, Promega®); 0,5µl de dNTP (10 mM, Promega®); 0,6 U de Taq DNA polimerase (5U/µL, Promega®) e 0,5µl de cada oligonucleotídeo

(*forward* e *reverse*)(10 pmol/MI, IDT®). A sequência de nucleotídeos utilizados e o tamanho dos produtos de PCR estão listados no quadro 2.1.

As amostras seguiram para o termociclador (Bio-rad®). Para cada reação, foram feitos testes com controles negativos, utilizando água ultrapura no lugar do DNA no preparado e controles positivos, utilizando-se uma cepa *S. aureus* específica. A desnaturação, extensão e anelamento sofreram variações de acordo com cada oligonucleotídeo, sendo assim os ciclos de temperatura de amplificação em termociclador seguiram de acordo com o correspondente autor: AroA controle positivo USA 400 (Marcos *et al.*, 1999); SEA controle positivo ATCC 25923, SEB controle positivo ATCC 25923, SEC controle positivo ATCC 25923 (Medeiros *et al.*, 2013); SEE controle positivo ATCC 27664 (Mclauchlin *et al.*, 2000) (ATCC: American Type Culture Collection); e MecA controle positivo USA 400 (Jonas *et al.*, 2002)

Todos os produtos da amplificação da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Kasvi®) a 2,4%. Foi utilizado como padrão de massa molecular de 100bp (Cellco®). A imagem do gel foi capturada sob a luz UV em transiluminador (Entela®).

2.4. Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As estirpes identificadas como *S. aureus*, foram transferidas para o caldo Müller-Hinton (Himedia®) e incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 horas, até alcançar turbidez de 0,5 na escala padrão McFarland, e em seguida inoculado em placa de petri com ágar Müller-Hinton (Himedia®), segundo o método de disco difusão, em recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

Foram testadas as seguintes bases farmacológicas: cefoxitina 30µg, oxacilina 1µg, gentamicina 10µg, ciprofloxacina 5µg, clindamicina 2µg, amoxicilina 10µg, cloranfenicol 30µg, ceftazidima 30µg, rifampicina 5µg, doxicilina 30µg, cefalotina 30µg, azitromicina 15µg, cefalexina 30µg (Newprov®). Os dados obtidos foram comparados com a tabela padrão de interpretação, conforme tabela do CLSI (2015).

2.5. Análise estatística

Para a análise dos dados coletados, desvio padrão e médias dos valores de contagem de *Staphylococcus* spp. em placas foi utilizado o programa Microsoft Office Excel® 2019. Na análise estatística para comparação entre médias da contagem estafilocócicas aplicou-se o teste de Kruskal Wallis. Em casos de rejeição da hipótese nula e para determinar a diferenciação das amostras relacionadas, foi empregada a análise 2X2 de Wilcoxon, aplicada a todas as amostras não binárias. Para as demais análises estatísticas, utilizou-se de uma análise de frequência, por teste de qui-quadrado de Pearson.

Apesar do trabalho utilizar valor de $P=0.05$ para testar as hipóteses nulas, algumas publicações recentes têm pontuado que não se deve nortear toda a base científica amparada pelo nível de significância, utilizando-o como um fator exclusivo, pela sua falta de acurácia e instabilidade, somado a não valorização dos dados da pesquisa (Nuzzo, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Localização geográfica e distribuição comercial de queijos tipo minas frescal contaminados por *Staphylococcus* spp.

A pesquisa abrangeu 134 queijos do tipo minas frescal, disponíveis aos consumidores por pontos de vendas formais ou informais, de 15 regiões administrativas, sendo cada uma com suas particularidades e renda média distintas, pertencentes a 6 macrorregiões extensão territorial do Distrito Federal (DF). A maior concentração amostral ocorreu no comércio informal (52/134) e na região administrativa do Guará (17/134), representando a Central Adjacente (43/134). Em contrapartida o mercado (6/134), a Granja do Torto (Central) (2/134) e a região Norte (7/134), se enquadram nos locais menos assistidos neste estudo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Distribuição das amostras coletadas entre as Unidades de Planejamento Territorial (UPT) do Distrito Federal e os ambientes comerciais.

UPT	Número de amostras de queijo minas frescal						Total
	Mercado informal	Casa de frios	Hortifruti	Mercado	Padaria	Supermer.	
Central	4	-	3	1	10	8	26
Central Adj.	13	2	4	4	9	11	43
Leste	4	3	-	1	2	3	13
Norte	2	-	-	-	2	3	7
Oeste	18	1	2	-	5	2	30
Sul	11	1	-	-	2	1	15
Total	52	7	9	6	30	28	134

(Supermer.: supermercado; Central Adj.: Central Adjacente)

O padrão microbiológico de *Staphylococcus* spp. dos queijos isolados variou entre nenhum crescimento em placa ($<10^1$ UFC/g), todas originárias de médio e grande porte de redes de supermercados (3/134) pertencentes a Taguatinga (Oeste), Núcleo Bandeirante (Central Adjacente) e Cruzeiro (Central), ao queijo com maior contaminação, com $5,8 \times 10^{11}$ UFC/g, oriundo do mercado informal de Ceilândia (Oeste). Consecutivamente esta região se destaca com a maior média, $2,8 \times 10^{10}$ UFC/g. Da mesma forma, houve uma proeminência da carga microbiana do gênero *Staphylococcus* nas amostras do mercado informal atingindo a média $1,4 \times 10^{10}$ UFC/g. Enquanto a região de menor contaminação média estafilocócica foi a Sul, $9,9 \times 10^6$ UFC/g, e o ambiente comercial com menores índices foram supermercados com $1,5 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Distribuição da média de contaminação dos queijos minas frescal por *Staphylococcus* spp. entre as Unidades Planejamento Territorial (UPT) e pontos de venda.

UPT	Média de contaminação por <i>Staphylococcus</i> spp. ($\times 10^6$ UFC/g)						
	Mercado informal	Casa de frios	Hortifruti	Mercado	Padaria	Supermer.	Total
Central	1,27	-	3,44	0,90	78,55	1,84	31,41
Central Adj.	3091,94	5,00	8,81	15,88	3346,27	1,26	1638,01
Leste	2,79	40,64	-	8,45	3,01	4,34	12,35
Norte	0,14	-	-	-	36,00	0,01	10,32
Oeste	39450,23	190,00	325 00,80	-	189,20	0,05	28041,45
Sul	10,69	5,95	-	-	12,07	1,00	9,91
Total	14431,4	46,84	1182,62	12,14	1065	1,54	6812,51

(Supermer.: supermercado; Central Adj.: Central Adjacente)

Foi evidenciado diferença estatística entre média de contaminação por espécies de *Staphylococcus* e a RA ($P=0.01$), destacando Jardim Botânico comparado ao

Paranoá (P=0.04), ao São Sebastião (P= 0.02), ao Guará (p=0.01), à Águas Claras (P=0.05), à Ceilândia (p= 0.008), à Taguatinga (p=0.02), ao Gama (p=0.01), ao Riacho Fundo(p=0.03), e ao Plano Piloto (P=0.01); houve diferença também entre Sobradinho e São Sebastião (P= 0.03), Guará(P=0.02), Ceilândia (P=0.008), Gama (P=0.01), Riacho Fundo (P=0.05) e Plano Piloto (P=0.03); entre Guará e Sudoeste (P=0.04); e por fim entre Ceilândia e Águas Claras (P=0.01), Taguatinga (P=0.04) e Sudoeste (P=0.01). Assim como com as UPT (P=0.05), houve diferença estatística ao comparar a região Oeste à Adjacente (P=0.05), à Central (P=0.01) e ao Norte (P=0.01); comparado Sul ao Norte (P=0.01) e à Central (P=0.04); e entre Norte à Central Adjacente (P=0.05) e ao Leste (P=0.05).

Embora a UPT Oeste, em especial a RA de Ceilândia, tenha se sobressaído com altos títulos de contaminação dentre as demais regiões, houve flutuação bastante drástica na qualidade microbiológica entre os queijos estudados da região, como entre os grupos do supermercado e informal.

Frente aos tipos de empreendimentos comerciais foram encontrados diferentes níveis de contaminação por *Staphylococcus* spp. (P= <0,0001). Na comparação estatística houve destaque entre: hortifruti (P=0,02), padaria (P=<0.0001), casa de frios (P=0.001), informal (P=<0.0001), mercado (P=0.003) quando comparados ao supermercado, o qual apresentou menores taxas de crescimento em placa; e valores entre hortifruti (P=0.04), informal (P=0.02) comparados a casa de frios. No mais, vale ressaltar que, estatisticamente, não houve distinção entre contaminação dos queijos obtidos entre padaria, mercado e hortifruti aos produtos comercializados informalmente no Distrito Federal, o que se deve possivelmente a divergência entre o índice de contaminação das amostras analisadas, outra hipótese seria fontes comum da origem dos derivados lácteos, em diferentes tipos de empreendimentos.

3.2. Identificação molecular de cepas *Staphylococcus aureus*, genes de virulência, MRSA e antibiograma

Tabela 2.3: Distribuição, no comércio e Unidade de Planejamento Territorial, de amostras de queijo minas frescal contaminadas por *Staphylococcus aureus* e presença dos genes de enterotoxinas e resistência.

UPT	Amostras contaminadas por <i>S.aureus</i> (Número de estirpes com genes SE/ MecA)						Total
	Mercado informal	Casa de frios	Hortifruti	Mercado	Padaria	Supermer.	
Central	-	-	1	-	1	-	2
Central Adj.	4 (1SEA/ 1SEC/ 1SEA + SEE)	1	-	-	2	-	7
Leste	1	1 (1SEE + MecA)	-	-	1 (1 SEA)	2	5
Norte	2	-	-	-	1	-	3
Oeste	11 (2 SEA)	-	-	-	2 (1 SEC)	1	14
Sul	6 (1 SEA)	-	-	-	-	1	7
Total	24	2	1	-	7	4	38

Dentre as 4 estirpes de *S. aureus* da Central Adj. (Central Adjacente) do mercado informal, 3 estirpes apresentaram 4 genes de enterotoxinas (1 estirpe com gene SEA, 1 estirpe com gene SEC e 1 estirpe com SEA e SEE). Em 1 estirpe da região Leste, oriunda de casa de frios, apresentou 2 genes de virulência (1 estirpe com SEE e MecA), e em 1 outra estirpe da mesma região, de padaria, apresentou 1 gene de enterotoxina (1 estirpe com gene SEA). Na região Oeste, dentre 11 estirpes, do mercado informal, foram encontrados 2 genes de enterotoxina (2 estirpes com gene SEA), e dentre 2 estirpes foi encontrada, na mesma região em padaria, a presença de 1 gene de enterotoxina (1 estirpe com gene SEC). E dentre 6 estirpes da região Sul, do mercado informal, apenas 1 gene de enterotoxina foi identificado (1 estirpe com gene SEA). (Supermer.: supermercado; SEA, SEC, SEE: genes de enterotoxinas, MecA: gene de resistência a meticilina)

Dentre as 134 amostras de queijos coletados, em 54 isolados (54/134) foram detectadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positivas, pré-selecionados pelo teste da coagulase e bioquímica, e posterior confirmação com PCR pelo gene espécie-específico AroA em amostras de queijo minas frescal, na qual resultou em 38 (38/134) estirpes de diferentes amostras distribuídas por todo o DF(Tabela 2.3).

A maior concentração de amostras contaminadas por *S. aureus* foi encontrada no comércio informal (24/38), em Taguatinga (9/38) reforçando a região Oeste (14/38). Os locais de menor ocorrência de isolados do agente tanto no mercado, assim como

as RAs: Granja do Torto (Central), Cruzeiro (Central), Águas Claras (Central Adjacente) e Núcleo Bandeirantes (Central Adjacente), onde não foram isolados nenhum *S. aureus* (0/38), e consecutivamente a macrorregião de menor frequência foi a Central (2/38) .

O teste estatístico identificou diferenças significativas entre a presença de *Staphylococcus aureus* e as Regiões Administrativas (P=0.01), salientando principalmente: Sobradinho (P=0.02), Gama (P=0.01), Guará (P=0.01), Ceilândia (P=0.03), Taguatinga (P= 0.02) e Sudoeste (P=0.04) quando comparado ao Plano Piloto; Sobradinho (P=0.04), Guará (P=0.04) e Gama (P=0.02) comparando à Águas Claras. Quanto as UPT identificou-se uma diferença (P=0.03) destacando-se a Central quanto a região Leste (P= 0.01), a Norte (P= 0.02), a Oeste (P=0.001) e a Sul (P=0.003); e Adjacente quanto a região Oeste (P= 0.004) e a Sul (P= 0.01). Em contrapartida a região Oeste e Sul obtiveram proximidade estatística nos resultados obtidos (P=1)

A elevada contagem média de *Staphylococcus* spp., não está correlacionada como um fator diretamente determinante para a presença de *S. aureus*. Todavia, houve diferença estatística entre a presença do agente correlacionado ao ambiente de venda do queijo (P=0.008). Locais como padaria (P=0.04), supermercado (P= 0.004), mercado (P=0.02) e hortifruti (P= 0.02) foram destacados ao confrontar com o mercado informal.

É possível correlacionar o maior número de amostras contaminadas por *S. aureus* àquele empreendimento de maior carga microbiológica estafilocócica média, mercado informal ($1,4 \times 10^{10}$ UFC/g e 24/38 amostras contendo *S. aureus*), fato este

também existente quando avaliado as UPT na região Oeste (2,8 X10¹⁰UFC/g e 14/38 amostras contendo *S. aureus*).

Os genes de enterotoxinas encontradas nos isolados de *S.aureus* foram SEA (6/38), SEC (2/38) e SEE (2/38). Não foi observada a presença de SEB em nenhuma das amostras analisadas. O ponto de venda com maior índice de cepas (6) toxigênicas foi no comércio informal (7/10 genes). Dentre as regiões, o Guará (Central Adjacente) apresentou maior número de isolados de *S. aureus* enterotoxigênicos, com 3 cepas (4/10 genes), na qual uma delas continha a presença de 2 genes (SEA e SEE). Enquanto a região Central e Norte não foram encontrados nenhum dos genes de enterotoxinas.

Foi identificado um isolado com o gene *MecA*, associado a presença do toxina E, em um queijo comercializado em uma casa de frios, de São Sebastião, região Leste. Não houve influência na análise estatística entre as regiões administrativas e UPTs do Distrito Federal aos resultados obtidos dos genes de *MecA*, SEA, SEB, SEC e SEE e resultados do antibiograma *in vitro* frente às drogas testadas.

Tabela 2.4: Resistência aos antimicrobianos entre 38 estirpes de *S. aureus* isolados de queijo minas frescal coletados distribuídas entre as Unidades de Planejamento Territorial do Distrito Federal.

UPT	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes aos antimicrobianos												
	Cefoxitina	Oxacilina	Gentamicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Amoxicilina	Cloranfenicol	Ceftazidima	Rifampicina	Doxicilina	Cefalotina	Azitromicina	Cefalexina
Central	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	0	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (100%)	0	0	1 (50%)	2 (100%)	0
Central Adj. Leste	3 (43%)	3 (43%)	4 (57%)	2 (29%)	6 (86%)	1 (14%)	3 (75%)	7 (100%)	0	1 (25%)	3 (43%)	6 (86%)	1 (33%)
Norte	3 (60%)	3 (60%)	4 (80%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)	0	5 (100%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (33%)	4 (80%)	2 (40%)
Oeste	2 (67%)	2 (67%)	0	1 (33%)	2 (67%)	0	1 (33%)	3 (100%)	0	0	1 (33%)	2 (67%)	0
Sul	11 (79%)	10 (71%)	8 (62%)	11 (79%)	13 (93%)	1 (8%)	4 (31%)	13 (93%)	3 (21%)	4 (36%)	5 (36%)	9 (64%)	2 (22%)
Total	3 (43%)	4 (57%)	2 (29%)	2 (29%)	4 (57%)	1 (29%)	0	6 (86%)	0	1 (17%)	2 (29%)	4 (57%)	1 (17%)
	23 (61%)	23 (61%)	19 (51%)	17 (46%)	30 (79%)	5 (14%)	8 (25%)	36 (95%)	4 (11%)	8 (27%)	13 (36%)	27 (71%)	6 (23%)

Os resultados do antibiograma por difusão em disco dos *S. aureus* demonstraram isolados resistentes às drogas antimicrobianas principalmente às drogas ceftazidima (36/38), clindamicina (30/38) e azitromicina (27/38) (Tabela 2.4 e 2.5). Entre as bactérias testadas, uma se destacou sendo sensível a todos os antibióticos testados, originária do Gama (Sul), do mercado informal. Em contra partida, a cepa com maior índice de resistência às drogas testadas foi de Ceilândia (Oeste), também do mercado informal, em que expressou susceptibilidade a apenas uma droga (doxiciclina).

Tabela 2.5: Resistência aos antimicrobianos entre 38 estirpes de *S. aureus* isolados de queijo minas frescal coletados, distribuídas entre os tipos de comércios do Distrito Federal

Ponto de venda	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes aos antimicrobianos												
	Cefoxitina	Oxacilina	Gentamicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Amoxicilina	Cloranfenicol	Ceftazidima	Rifampicina	Doxiciclina	Cefalotina	Azitromicina	Cefalexina
Casa de frios	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	0	2 (100%)	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0
Hortifruti	0	0	1 (100%)	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0	0	1 (100%)	0
Mercado informal	16 (67%)	16 (67%)	11 (48%)	14 (58%)	19 (79%)	1 (4%)	2 (19%)	22 (92%)	4 (17%)	4 (21%)	11 (46%)	13 (54%)	5 (27%)
Padaria	3 (43%)	3 (43%)	2 (29%)	2 (33%)	5 (71%)	3 (43%)	4 (57%)	7 (100%)	0	1 (25%)	1 (17%)	7 (100%)	0
Supermer.	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)	0	3 (75%)	0	0	4 (100%)	0	2 (50%)	0	4 (100%)	1 (25%)
Total	23 (61%)	23 (61%)	19 (51%)	17 (46%)	30 (79%)	5 (14%)	8 (25%)	36 (95%)	4 (11%)	8 (27%)	13 (36%)	27 (71%)	6 (23%)

(Central Adj.: Central Adjacente; Supermer.: supermercado)

Ao comparar estatisticamente os resultados do antibiograma ao tipo de comércio revela significância para a amoxicilina ($P=0.04$), com destaque nas diferenças entre ambiente informal com as padarias ($P=0.008$) e com casa de frios ($P=0.02$).

Foi identificado um isolado com o gene *MecA*, associado a presença do toxina E, em um queijo comercializado em uma casa de frios, de São Sebastião, região Leste. Não houve influência na análise estatística entre as regiões administrativas e

UPTs do Distrito Federal aos resultados obtidos dos genes de MecA, SEA, SEB, SEC e SEE e resultados do antibiograma *in vitro* frente às drogas testadas.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado a presença de *S. aureus* em 28% (38/134) das amostras de queijo tipo Minas Frescal expostos à venda em 16 RAs do DF, valor inferior àquele encontrado por André *et al.* (2008) com 71% (17/24) de amostras de queijo minas frescal do estado vizinho, Goiás, GO, Brasil.

Foi observada também a presença de isolados que não confirmaram a existência de gene *AroA* para *S. aureus* (16/54), e por serem coagulase positivas carregam potencial patogênico ao homem. São exemplos de espécies coagulase positiva de importância alimentar: *S. intermedius*, *S. chromogenes* e *S. hyicus*, com capacidade para produção de enterotoxinas e envolvidos em surtos (Khambaty, *et al.*, 2001; Cunha Neto *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2011; Ferrasso *et al.*, 2015).

É necessário destacar que este foi o primeiro trabalho desenvolvido para a detecção de *S. aureus* nas unidades de RA do DF. A importância de se analisar a presença de *S. aureus* neste tipo de matriz está relacionada com as doenças transmitidas por alimentos (DTA) que apresentam abrangência mundial e destacam-se como um dos problemas mais frequentes em saúde pública (Medeiro *et al.*, 2013).

Normalmente os surtos por DTAs estão associados com baixa qualidade microbiológica dos alimentos, fator influenciado pela matéria prima com altos níveis de contaminação microbiológica, deficiências em higiene na fazenda, fraco controle sanitário, falha no tratamento térmico, contaminação pós pasteurização, condições precárias de processamento no laticínio, entre outros (Kümmel *et al.*, 2016; Cousin *et al.*, 2018). No entanto, no DF, são raros os relatos na literatura que comprovem a

ocorrência de surtos por intoxicação envolvendo bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva (Nunes *et al.*, 2013).

A contaminação do queijo por bactérias do gênero *Staphylococcus* pode ocorrer em diferentes estágios de produção/ estocagem do produto, principalmente com condições favoráveis na qual estimulam a produção de toxinas (Cunha Neto *et al.*, 2002). Segundo Pereira *et al.* (2018) a quantidade de toxina suficiente para provocar DTA é observada quando *Staphylococcus* spp. excedem a contagem de 10^5 UFC/g, neste estudo essa carga microbiana corresponde a 77% (103/134) das amostras de queijo analisadas.

Em um estudo no Paraná, foram encontrados 21/40 (53%) queijos com contagem estafilocócica $>5 \times 10^4$ UFC/g, sendo considerados fora do padrão pelo autor (Pinto *et al.*, 2011). Considerando padrão estabelecido por Pinto *et al.* (2011) e comparando com os dados obtidos neste estudo, foram encontrados 109/134 (81%) derivados lácteos em desconformidade. Neste estudo não foi possível identificar as possíveis fontes de contaminação dos queijos tendo em vista a não investigação da origem da produção dos queijos utilizados na pesquisa.

A presença da toxina A obteve destaque nos isolados (6/38). Esta toxina é comumente evidenciada em outros estudos envolvendo estirpes de *S.aureus* em leite e seus derivados, como o encontrado no estado do Rio de Janeiro em 15/111 estirpes (Costa *et al.*,2012), ou no estado do Alagoas com 9/27 estirpes (Acosta *et al.*, 2017).

Todavia a simples presença do isolado toxigênicos de *S. aureus* no alimento não implica na ocorrência de intoxicações, porém ressalta o potencial risco existente quando pequenas concentrações da enterotoxina são suficientes para causar DTA em humanos, principalmente indivíduos debilitados (Medeiros *et al.*, 2013).

É abundante os relatos na literatura ressaltando a resistência aos antibióticos β -lactâmicos frequentemente encontrada em estirpes de *S. aureus*, especialmente obtidas de leite e derivados (Xu *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2016), como o encontrado neste estudo com elevado nível de resistência a ceftazidima (36/38) e a cepa MRSA (1/38).

A resistência bacteriana é um importante fator que atinge mundialmente a população, e necessita pesquisas destinadas a solução da crise já estabelecida, visando principalmente o desenvolvimento de medidas de controle efetivas, já que pesquisadores se mostram pessimistas ao futuro da humanidade (Van Duin *et al.*, 2016; Piddock, 2017).

Seja pela qualidade microbiológica ou pelos fatores de virulência detectados nos isolados dos queijos minas frescal estudados do Distrito Federal, os grupos que representam maior risco, de forma geral, foram determinados na Ceilândia (Oeste) e Guará (Central Adjacente); e aqueles comercializados por padarias, hortifrutis e informalmente. Ressalte-se que queijos dos supermercados, cujos produtos tem carimbo SIF- Serviço de Inspeção Federal, não foram encontradas contaminações bacterianas para *Staphylococcus aureus*.

O comércio informal (até o momento) não costumava a ser rotineiramente fiscalizado no Distrito Federal, sendo assim, não segue os critérios legais e normativos alimentares (Brasil, 1997a; Brasil, 1997b; Brasil, 2019a; Brasil, 2019b) como a maioria dos demais pontos de vendas. Na qual é comum a venda de queijos provenientes de fabricação informal, não fiscalizado. O queijo de fabricação informal geralmente é produzido a partir do leite que não recebeu o correto tratamento e higiene para obtenção de uma matéria prima de qualidade (Amorin *et al.*, 2014)..

Mesmo que exista uma resolução atual para estabelecimento do controle microbiológico para os derivados lácteos, que estabelece limites mínimos de contaminação dos *Staphylococcus*, apenas para aquelas espécies coagulase positiva (10^3) e a detecção de toxinas prontamente disponíveis no produto final. (Brasil, 2019 a; Brasil, 2019 b).

Os resultados do estudo sugerem que são poucas e insatisfatórias as intervenções direcionadas para o controle geral das espécies de *Staphylococcus*, assim como o controle das enterotoxinas, na fazenda, nos laticínios ou nos seus pontos de vendas.

Há necessidade de elaboração e promoção de programas de controle eficientes em toda a cadeia produtiva, e constante vigilância, pois trata-se do dever dos profissionais da área de alimentos e saúde a proteção dos consumidores contra as DTA (Cunha Neto *et al.*, 2002).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo houve a identificação de um grande número de amostras de queijo minas frescal contaminados por *Staphylococcus* spp. identificada em queijos minas frescal comercializados no Distrito Federal. Foi descoberta a presença de espécimes de *Staphylococcus* coagulase positivos nos queijos analisados, com a identificação de estirpes enteroxigênicas e MRSA.

Este foi o primeiro ensaio, de âmbito do Distrito Federal, abordando parâmetros relativos a toxigenicidade, resistência, sanidade e locais de risco. Diagnosticou-se a necessidade de práticas intervencionais tanto no território da região Oeste do DF, regiões e mercado informal, destacadas por apresentar maiores médias por contaminação estafilocócica, presença de *S. aureus* e de toxinas.

Os resultados indicam problemas sanitários do sistema produtivo e fiscalizatório na indústria do setor e seus pontos de venda no DF. No entanto, os mesmos impasses, oferecidos pelos resultados deste estudo, fornecem ferramentas valiosas na prática de ações para controle do agente e promoção da saúde do consumidor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. C., Santos, S. J. D., Albuquerque, L., Soares, K. D. A., Mota, R. A., Medeiros, E. S. D., 2017. Frequência de genes codificadores de toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques expansão comunitários. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(7), 691-696.
- Amorim, A.L.B.C., Couto, E.P., Santana, A.P., Ribeiro, J.L., Ferreira, M.A, 2014. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 73(4), 364-7.
- Andrade, A. P. C., Borges, M. F., Figueiredo, E. A. T., Machado, T. F., Porto, B. C., 2011. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. *Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical*.
- André, M. C. D., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., Serafini, A. B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control*, 19(2), 200-207.
- Brasil, 1997. Portaria nº 352/1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, a.
- Brasil, 1997. Portaria nº 368/1997 do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos elaboradores/ Industrializadores de Alimentos.b.
- Brasil, 2001. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12/2001 de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.
- Brasil, 2003. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359/2003 do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional.
- Brasil, 2019. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, Diário Oficial República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Edição 249, Seção 1, p.133.b.
- Brasil, 2019. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Edição 249, Seção 1, p. 96.a.

Brasil, 2018. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília.
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>

Carvalho, J. D. G., Viotto, W. H., Kuaye, A. Y., 2007. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, 18(3), 262-267.
CDC-Center for Diseases Control (US), 2003. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1993-1997.

Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P. M., 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.

CLSI, 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA. *CLSI document M100-S25*.

CODEPLAN, C. D. P. D. D., 2019 . Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílio (PDAD)–2018, Distrito Federal. Disponível em: http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2019/03/PDAD_DF-Grupo-de-Renda-compactado.pdf

Costa, J. C. B., Freitas, E. I., Lemos, A. A., Rosas, C. D. O., Medeiros, V. D. M., Warnken, M. B., Marin, V. A., 2012. Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes. 71(2):250-8.

Cousin, M. E., Härdi-Landerer, M. C., Völk, V., Bodmer, M., 2018. Control of *Staphylococcus aureus* in dairy herds in a region with raw milk cheese production: farmers' attitudes, knowledge, behaviour and belief in self-efficacy. *BMC veterinary research*, 14(1), 46.

Cunha Neto, A. D., Silva, C. G. M. D., Stamford, T. L. M., 2002. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Food Science and Technology*, 22(3), 263-271.

Faúla, L. L., Soares, A. C. C., Dias, R. S. 2017. Panorama dos surtos de doença de transmissão alimentar (DTA) ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. *Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG*, 3(1), 86-95.

Ferrasso, M. D. M., Gonzalez, H. D. L., Timm, C. D., 2015. *Staphylococcus hyicus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82.

Ferreira, M. A., Bernardo, L. G., Neves, L. S., Campos, M. R. H., Lamaro-Cardoso, J., André, M. C. P., 2016. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. *Journal of dairy science*, 99(11), 8589-8597.

Garcia, D. P., Duarte, D. A., 2014. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 6(1), 545-54.

García-Álvarez, L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D., Parkhill, J., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel MecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*, 11(8), 595-603.

Jonas, D., Speck, M., Daschner, F. D., Grundmann, H., 2002. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1821-1823.

Khambaty, F. M., Bennett, R. W., Shah, D. B., 1994. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology & Infection*, 113(1), 75-81.

Kong, C., Neoh, H. M., Nathan, S., 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins*, 8(3), 72.

Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Ehling-Schulz, M., 2016. *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Frontiers in microbiology*, 7, 1603.

Marcos, J. Y., Soriano, A. C., Salazar, M. S., Moral, C. H., Ramos, S. S., Smeltzer, M. S., Carrasco, G. N., 1999. Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the AroA Gene. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 570-574.

McLauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of food protection*, 63(4), 479-488.

Medeiros, M. I. M. D., Nader Filho, A., Souza, V. D., Melo, P. D. C., Ferreira, L. M., Canalejo, L. M. M., 2013. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. *Ciência Animal Brasileira*, 14(1), 98-105.

Mercosul, 1996. Resolução GMC nº145/96, Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal.

Mercosul, 1998. Resolução GMC nº44/98, Correção da Resolução GMC N° 145/96 Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal.

Nunes, M. M., de Alencar Mota, A. L. A., Caldas, E. D., 2013. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. *Food Control*, 34(1), 235-240.

Nuzzo, R., 2014. Scientific method: statistical errors. *Nature News*, 506(7487), 150.

Pereira, C. T. M., de Oliveira, D. S. V., Veloso, V. S., Silva, S. D. S. P., Santos, L. S., Lima, A. F., dos Santos Soares, M. J., 2018. Microbiology quality, detection of

enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(5), 1957-1967.

Piddock, L. J., 2017. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 639-640.

Pinto, F. G. S., Souza, M., Saling, S., Moura, A. C., 2011. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78(2), 191-198.

Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B.; Carter, G. R., 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe-Mosby, 648p.

Rocha, J. S. D., Buriti, F. C. A., Saad, S. M. I., 2006. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(2), 263-272.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Van Duin, D., Paterson, D. L., 2016. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infectious Disease Clinics*, 30(2), 377-390.

Xu, J., Shi, C., Song, M., Xu, X., Yang, P., Paoli, G., Shi, X., 2014. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai. *Journal of food science*, 79(4), M635-M642.

CAPITULO III

MOLECULAR TYPING OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM MASTITIC MILK AND MINAS FRESH CHEESE IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL.

Tipificação molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico e queijo minas frescal no Distrito Federal, Brasil.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an opportunistic bacterial agent that is present in the normal mammalian microbiota and can cause bovine mastitis. It is one of the main pathogens contaminating dairy products, whether by human or bovine origin, and can endanger public health, especially if the strain carries virulence genes. The aim of this work was to analyse the *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk with subclinical mastitis and Minas fresh cheese samples, obtained in the Federal District area, Brazil. Microbiological isolation, biochemical characterization "in vitro" and molecular biology technique were performed. 55 strains from mastitic milk and 38 strains from Minas Fresh cheese of *Staphylococcus aureus* were isolated. All strains were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) to *S. aureus* species specific gene (AroA), coagulase (CoA) and enterotoxins (SEA, SEC and SEE). A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed on 21 randomly selected strains: 18/38 of cheese strains and 3/55 of mastitic milk strains. All strains were positive for the AroA and CoA genes (93). The predominance of the 600bp CoA gene amplification fragment was detected in the strains from milk (33/55) and cheese (16/38). Staphylococcal enterotoxin was observed in 16 SEA, 4 SEC and 16 SEE identified in *S. aureus* milk; and 6 SEA, 2 SEC and 2 SEE in cheese strains. In the PFGE analysis, 19 patterns were detected with genetic similarity above 70%. Two clones were found, one among strains originating from milk and cheese, and the other in cheese from different regions. The genotypic analyzed correspondence between the strains suggests contamination from an animal source, and the maintenance of the same strains through the production chain from the raw material. Possibly caused by a failure during pasteurization and handling in the production process, reinforcing the need for better

control measures of food hygiene. The genetic correspondence of this study indicates the contamination of the animals by origin, and the maintenance of the first lines, through the production chain from raw materials, implies the probable failure of pasteurization and handling in the production process, reforming the control practices best food hygiene.

Keywords: Bovine subclinical mastitis. Genotyping. Food safety. Dairy. Foodborne pathogen.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um agente bacteriano oportunista que está presente na microbiota normal de mamíferos e causa mastite bovina. É um dos principais patógenos contaminantes de produtos lácteos, por origem humana ou bovina, e pode colocar em risco a saúde pública, especialmente caso o isolado possua genes de virulência. O objetivo deste estudo foi analisar as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite de bovinos com mastite subclínica e queijo minas frescal, obtidas na região do Distrito Federal, Brasil. Foi realizado isolamento microbiológico, caracterização bioquímica “*in vitro*” e técnica de biologia molecular. Foram isoladas 55 estirpes de leite mastítico e 38 estirpes de queijo minas frescal de *Staphylococcus aureus*. Todas as cepas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase ao gene específico da espécie *S. aureus* (AroA), coagulase (CoA), enterotoxinas (SEA, SEC e SEE). A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi realizada em 21 linhagens selecionadas aleatoriamente, sendo 18/38 de linhagens do queijo e 3/55 da linhagem do leite mastítico. Todas as estirpes foram positivas para os genes AroA e CoA (93). Foi detectada a predominância do fragmento de amplificação do gene CoA de 600pb nas linhagens oriundas do leite (33/55) e do queijo (16/38). Observou-se a presença de enterotoxina estafilocócica em 16 SEA 4 SEC e 16 SEE isolados de *S. aureus* no leite; e 6 SEA, 2 SEC e 2 SEE em isolados de queijo. Na análise PFGE, foram detectados 19 perfis, todas com similaridade genotípica acima de 70%. Foi encontrado 2 clones, um entre cepas originária do leite e queijo e outro do queijo de diferentes regiões. A correspondência genotípica entre as estirpes estudadas indica contaminação dos queijos por origem animal, e a manutenção das mesmas linhagens através da cadeia produtiva a partir da matéria-prima. Possivelmente provocado por uma falha de pasteurização e manuseio no processo produtivo, reforçando a necessidade de melhores medidas de controle de higiene alimentar.

Palavras-chaves: Mastite subclínica bovina. Genotipificação. Segurança alimentar. Derivados lácteos. Patógeno de origem alimentar.

1. INTRODUCTION

S. aureus has developed a profusion of strategies to survive in various environments, including mammalian hosts, due to the capacity of producing a large variety of virulence factors, antibiotic resistance (particularly beta-lactams - MRSA) and the ability to collect multiple of those genes and become more virulent (Hookey, Richardson & Cookson, 1998, Jonas et al. 2002, Kong et al. 2016, Fox, Jiang & Gobius, 2018). All these features reflect the importance of this microorganism which spreads across continents (Dallal et al. 2016).

One of the most significant virulent factors are the enterotoxins (SE), the causative of staphylococcal food poisoning, that is common in animal products (Riva et al. 2015). These thermostable enterotoxins are produced during the agent multiplication and under favorable conditions. The main toxins subtypes involved in the global outbreaks that cause disease are SEA, SEB, SEC, SED and SEE (Fox, Jiang & Gobius, 2018). Its clinical signs begins within hours after ingestion and is characterized as emetic and / or diarrheal (Wei & Chiou, 2002).

Other important virulence factor is the coagulase enzyme (CoA gene) which has a prominent role in the infectious process: initiating the attachment to structures, biofilm formation, the capacity of aggravating the infectious condition and antigenic properties, due its polymorphic genetic feature. It has been widely utilized to define strains profile (Malachowa et al. 2016; Dallal et al. 2016; Effendi et al. 2019).

The staphylococcal genotyping profile is important since it provides support for prevention and other measures that minimize future infections and toxoinfections in the

population (Kong et al. 2016). The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique is considered a gold standard discriminatory methodology for characterizing the pathogenic strain and is fundamental for epidemiological purposes, widely applicable in staphylococcal studies, especially involved in foodborne outbreak (Wei & Chiou, 2002, He, Xie & Reed, 2014, Chen & Xie, 2019).

There are few reports worldwide that correlate *S. aureus* in bovine-derived dairy products using PFGE (Hennekinne et al. 2003, Jørgensen, Mørk & Rørvik, 2005, Walcher et al. 2014, Hunt et al. 2012, Can, Elmali & Karagöz, 2017, Castañeda-Ruelas, Soto-Beltrán & Chaidez, 2017). In Brazil, epidemiological-molecular study of *S. aureus*, comparing milk and cheese by using the PFGE methodology is even rarer (Arcuri et al. 2010, Silveira-Filho et al. 2014), with just one research in the Midwest region (André et al. 2008). In the Federal District (FD), there were no reports addressing the topic.

The FD stands out for being located in the Midwest region with the highest cattle concentration and one of the largest dairy basins in the country. In order to identify the importance of *S. aureus* in milk production and dairy industry regarding public health concerns, it is necessary to investigate the genetic heterogeneity between strains and trace its distribution throughout the chain production. Therefore, this study was conducted to analyze the molecular characterization between *Staphylococcus aureus* profile strain from bovine mastitic milk and Minas fresh cheese in the Federal District, Brazil.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling

2.1.1. Minas fresh cheese

A total of 139 samples of minas fresh cheese were analyzed for the presence of *S. aureus*. In order to simulate a real consumer situation, they were collected between June and September 2016 in retail stores, distributed across the 15 Administrative Regions in Federal District, Brazil: Granja do Torto (Central), Jardim Botânico (East), Paranoá (East), Riacho Fundo (South), São Sebastião (East), Sobradinho (North), Cruzeiro (Central), Sudoeste/Octogonal (Central), Plano Piloto (Central), Ceilândia (West), Gama (South), Águas Claras (Adjacent Central), Núcleo Bandeirante (Adjacent Central), Taguatinga (West) e Guará (Adjacent Central).

2.1.2. Bacterial strains from mastitic milk

The 55 *Staphylococcus aureus* strains from raw milk used in this study were acquired from the germplasm bank at the veterinary microbiology laboratory of Brasília University. These strains were characterized in previous studies by the same institution and were isolated from dairy cattle with subclinical mastitis detected by CMT (California mastitis test) (scoring 3+), on farms in the Federal District, Brazil, and surroundings, collected in periods prior to 2011.

2.2. Isolation and identification of *S. aureus* from minas fresh cheese

The cheese samples were prepared and cultured on Baird Parker agar according to Bennet and Lancette (2001) and Brazil (2001). Based on colony morphology, Gram staining, and biochemical test, the suspected colonies were identified as *S. aureus*, followed the protocol of Quinn et al. (1994) and Brazil (2001).

2.3. Molecular identification of *S. aureus* using PCR

The total DNA were extracted from all the *S. aureus* strains by phenol-chloroform method, according to what is described by Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989), and were identified by species-specific PCR (Table3.1).

Table 3.1: Oligonucleotide primers used for molecular identification of *S. aureus*, virulence determinant and MRSA genes.

Gene	Sequence of oligonucleotide	Amplified product (pb)	Reference
COA-1	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	540/ 600/ 680/ 850 (variable)	Salasia et al., (2011)
COA-2	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	540/ 600/ 680/ 850 (variable)	Salasia et al., (2011)
AROA-1	AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC	1153	Marcos et al., (1999)
AROA-2	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	1153	Marcos et al., (1999)
SEA-1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120	Medeiros et al., (2013)
SEA-2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	120	Medeiros et al., (2013)
SEC-1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257	Medeiros et al., (2013)
SEC-2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	257	Medeiros et al., (2013)
SEE-1	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	170	Mclauchlin et al., (2000)
SEE-2	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	170	Mclauchlin et al., (2000)
MECA-1	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310	Jonas et al., (2002)
MECA-2	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	Jonas et al., (2002)

(COA: coagulase gene, AROA: *S. aureus* species specific gene, SEA/SEC/SEE: enterotoxin gene A, C and E, MECA: methicillin resistance gene)

The PCR amplification were performed for AroA, CoA, MecA and 3 SE genes (SEA, SEC and SEE) using primers (oligonucleotide) previously described (Table 1), in a simplex PCR assay. The reaction was performed using 25 µl of the total volume of the PCR mixture, which consisted of 4 µL of extracted DNA; 0.5 µM of each primer (forward e reverse) (10 pmol/µl); 5µl of PCR buffer 5X (Promega); 10 mM of each dNTP (Promega) and 1.0 U Taq DNA polymerase (Promega). The amplification was performed in a thermal cycler (Bio-rad C1000), and the cycling conditions were described on table 3.2.

Table 3.2: PCR programs used for amplification of the genes

Steps/ Primer	COA	AROA	SEA/SEC/SEE			MECA
Initial	94°C	94°C	94°C			94°C
denaturation	5 min.	2 min.	4 min.			4 min.
Cycles	35	40	First	Second	38	30
Denaturation	94°C	92°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	1 min.	1 min	2 min.	2 min.	2 min.	45 sec.
Annealing	57°C	58°C	55°C	53°C	51°C	50°C
	2 min.	1 min.	1:30 min.	1:30 min.	1:30 min.	45 sec.
Extension	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	2 min.	1:30 min.	1:30 min.	1:30 min.	1:30 min.	1 min.
Final extension	72°C	72°C			72°C	72°C
	5 min.	10 min.			4 min.	2 min.
Maintenance	4°C	4°C			4°C	4°C
Positive control	ATCC 25923	USA 400	A: ATCC 13565	C: ATCC 25923	E: ATCC 27664	USA 400

(CoA: coagulase gene, AROA: *S. aureus* species specific gene, SEA/SEC/SEE: enterotoxin gene A, C and E, MecA: methicillin resistance gene, ATCC: American Type Culture Collection).

All reactions used type1 water as negative control and a specific strain as the reference of positive control. Finally, the amplified PCR products were resolved by electrophoresis in 2,4% agarose gel and visualized and documented under UV transilluminator.

2.4. Molecular typing of *S. aureus* using PFGE

A randomized sampling with the AroA positive strains, from cheese and milk were used to perform the PFGE. The Pulse Net protocol was used in this study, including DNA preparation according to methodology described in CDC (2012).

The gel was stained with ethidium bromide solution, 50 μ l (10mg / mL) in 500mL of distilled water, and was then bleached in distilled water and under UV light and was photographed (Bio-Rad Gel Doc XR). The BioNumerics bioinformatics software IV (Applied Maths) was used to analyze the restriction patterns from the PFGE.

2.5. Statistical analysis

The statistical analysis performed consisted on nonparametric techniques by Pearson's chi-square test, to evaluate significant differences between coagulase gene sizes and staphylococcal toxins encode. Adopting $P = 0.05$ to test null hypotheses.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of *S. aureus* in the examined samples of minas fresh cheese

A total of 134 samples of minas fresh cheese was collected from the DF in formal and informal stores and analyzed. From these 54 (40%) isolated types of coagulase-positive Staphylococci (CPS), based on conventional biochemical tests for phenotypic characterization were obtained, an amount greater than that found by Nunes (2013) who studied the same cheese from the FD, during 2000 to 2012, and discovered 22% (44/196) contaminated samples with CPS.

Staphylococcus spp. are related to several processing problems, mainly pasteurization failures, improper hygiene, and incorrect storage temperatures, however, the potential risk factor in public health is linked to *S. aureus* (Johler et al. 2015, Riva et al. 2015). The CPS were tested for genotypic characterization, evaluated by PCR in order to detect *S. aureus* specific genes with AROA gene (1153bp). 38/134 (28%) *Staphylococcus aureus* were determined. The results revealed lower values than those found by André et al. (2008) with 71% (17/24) of contaminated minas fresh cheese samples by *S.aureus* in Goiás, Brazil.

3.2. Molecular characterization with coagulase gene of *S. aureus* strains recovered from mastitic milk and minas fresh cheese samples

The gene expression of CoA polymorphic gene was observed for all (93/93) *S. aureus* isolates investigated (55 *Staphylococcus aureus* from a germplasm bank, isolated from milk of subclinical mastitic cows and 38 *S. aureus* from minas fresh

cheese). The genetic pattern from milk has the fragment length between 400-900pb to CoA gene, with prevalence of 600pb (33/55), without double bands in electrophoresis gel (Table 3.3). The same frequency was demonstrated in cheese with size 600pb (16/38), and the fragment length in cheese varied between 500-1000pb, with double fragments (5/38) in the amplicon size of 800/600 (4/38) and 700/600 (1/38).

Table 3.3: Isolated from milk and cheese *S. aureus* results of the PCR products from COA gene

Origin	Amplicons size (pb)								Total
	400	500	600	700	800	900	1000	Double	
<i>S.aureus</i>	400	500	600	700	800	900	1000	Double	Total
Milk	2 4%	3 5%	33 60%	6 11%	6 11%	5 9%	0 0%	0 0%	55
Minas fresh cheese	0 0%	1 3%	16 42%	3 8%	5 13%	6 16%	2 5%	5 13%	38
Total	2 2%	4 4%	49 53%	8 8%	11 12%	11 12%	2 4%	5 5%	93

The significant difference in the variation of the COA polymorphic gene occurred between both sample groups ($P = 0.04$), in which sizes 1000 and 400 ($P = 0.04$) and 600 ($P = 0.05$); double and 400 ($P = 0.008$), 500 ($P = 0.01$), 600 ($P = 0.03$), 700 ($P = 0.01$) and 800 ($P = 0.03$) were those statistically evidenced.

By using this methodology, it was detected diverse genotypes among the studied isolates, which suggests that *S. aureus* has considerable heterogeneity in the sampled DF region. Epidemiological studies based on CoA gene analysis have exhibited *S. aureus* isolates divided into several subtypes and suggested that determining the coagulotypes is potential to identify the culprit for most cases of bovine mastitis in different geographical areas (Effendi et al. 2019).

The total strains found in this study differed among 400 and 1000 bp sizes, as found by Reinoso et al. (2008), from bovine and human strains. While Coelho et al. (2011) found among 540 and 900 pb sizes from mastitic bovine milk.

In Argentina, this gene has been researched in human infections, with prevalence of the 700bp (7/15) 600bp (2/15) and 500bp (2/15) patterns in healthy humans, with only 2 types, 900bp (4/7) and 500bp (3/7), and in bovine mastitic milk with the amplicons 900bp (6/15), 600bp (3/15) and 500bp (3/15) (Reinoso et al. 2008). In Indonesia, a prevalence of 500bp (11/20) and 400bp (4/20) amplicon sizes were found in raw milk (Effendi et al. 2019).

Demonstrating that 600 and 500 bp strains have been widely disseminated in different countries, which evidences their evolutionary ability to maintain and diffuse the strain, or also called coevolution, due to the host-pathogen relationship. And so, suggest that the presence of 500bp *S. aureus* is more frequently found in healthy individuals. Whereas isolates from infections sources obtained a amplicons prevalence in 600 bp, which provides to this strain an aggressiveness characteristic (Marques et al. 2013, Sharma et al., 2017).

Hence, it could explain the high number of agents found with gene typing of 600bp (49/93) in this study, especially those from mastitic milk (33/55). The less common found genotypes could be incompetent in host colonization and were eliminated easily from the herd (Effendi et al. 2019).

3.3. Molecular enterotoxigenicity of *S. aureus* strains in milk and minas fresh cheese

Table 3.4: Isolated from milk and cheese *S. aureus* results of the PCR expression toxins encode (SEA, SEC e SEE) and resistance (MECA)

Origin <i>S. aureus</i>	SEA	SEC	SEE	MECA
Milk	16 29%	4 7%	16 29%	0 0%
Minas fresh cheese	6 16%	2 5%	2 5%	1 3%
Total	32 34%	6 6%	18 19%	1 1%

The enterotoxins tested, SEA, SEC and SEE, were present in 9/38 cheese strains, in which only 1/38 had multiple SEA and SEE gene; and 30/55 strains of milk obtained the toxins encode, just 6/55 had multiple toxins (4/55 SEA and SEE, 2/55 SEC and SEE) (Table 3.4). In which there was an agreement between the sample types, in which expressed predominance in milk and cheese to SEA (16/55 and 6/38, respectively), and significant difference between the sample groups referring to SEE, with cattle emphasis (16/55) ($P = 0.004$).

Staphylococcal food poisoning is one of the most common eating disorders related to dairy consumption caused by the staphylococcal enterotoxins (SE) consumption. Its production may be related to the poor quality of raw milk produced or to the conditions of treatment or subsequent contamination. In general, strains of *S. aureus* can be introduced to milk by direct udder excretion of the pathogen, environmental contamination or handling and processing raw milk and dairy products (Riva et al. 2015, Pereira et al., 2018).

Raw milk is a potential disseminator for the transmission of numerous microorganisms from human and animal, the use of a low-quality feedstock in unprocessed foods, such as fresh minas cheese, which uses a raw mass, represents a public health risk. As the fact occurred in the Minas Gerais state, Brazil, involving 378 people in 2 episode of Staphylococcal food poisoning isolated from the same cheese object of this study and the same region is common to produce dairy with unpasteurized milk (Do Carmo et al. 2002, Riva et al. 2015).

In the present study, 42% (39/93) strains containing SEA, SEC or SEE genes and 7% (7/93) with multiple genes were found. In similar studies, analyzing classical enterotoxins (SEA-D) with samples from milk cooling tanks and cheese, resulted in 25% (28/210) strains isolated with an only toxin, SEC (25/109 from cheese and 3/109 from milk) (Pereira et al. 2018).

While another study evaluated isolates of mastitic cows showed 92% (66/72) strains with some SE gene, being 8% (6/72) strains presenting all superantigens simultaneously (SE classic and toxic shock syndrome toxin-TSST-1) (Nader Filho et al. 2007). Both papers, like this study, suggested the toxin presence can be relative to infectious diseases Since both tables (3 and 4) emphasized the potential presence of virulence factors in samples from mammary gland infection over those foodborne.

Among the all 93 isolates, the lowest predominance of enterotoxins was found with the 500bp coagulase gene size in 1/93 (milk), while the highest predominance of SE was in the 600bp pattern in 18/93 strains, presenting different enterotoxins (17/55 of milk and 1/38 of the cheese) of these 2/93 had two SE genes (SEA-SEE). In the findings of this research, the higher frequency of multiple SE encodes (7/93) were

present in 800 bp pattern with 4/93 strains (3/55 of milk and 1/38 of cheese) and that all samples with 400 bp (2/2) and 1000 bp (2/2) amplicon presented SE.

There was a statistical significance when analyzing COA weight and the presence of Staphylococcal enterotoxin ($P=0.05$), those evidence where 400 and 700 ($P=0.03$) and double ($P=0.05$); and 1000 and 700 ($P=0.03$) and double ($P=0.05$). The data of the present work corroborate with the suspicion that the 600bp pattern is a more aggressive and persistent profile, the incidence association between the toxin encode and herd mastitis, besides the low correlated malignancy with the 500bp genotype. Raises other hypotheses for the less present, but with high enterotoxin gene rate, 1000 and 400 bp, and those with multiple encodes (800 bp), but without literature reference.

3.4. MRSA strains detection in milk and minas fresh cheese

The resistance to methicillin MRSA (MecA) is acquired horizontally by gene transfer, located in gene cassettes or plasmids, between distinct lineages and species of completely distant phylogenetic groups (Mahmoudi et al. 2017).

The MRSA was found in only a single strain (1/93) of minas fresh cheese, originating from the São Sebastião region (East) from a cheese store with a 600 bp coagulase genotype and also with the presence of SEE gene. As the presence of MRSA was not found in the strains of milk analyzed it is possible its origin from human contamination after milk ejection. This might imply that there was a successful transference of bacteria by the handler during cheese making or at retail, which demonstrates failure in production practices in the middle or end of the production chain.

The danger of MRSA was not associated only with its presence, but when gene transfer occurs, other virulence factors may be transferred, such as the presence of community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) is usually associated with the Panton-Valentine leukocidin (PVL), a cytotoxin that causes leukocyte death and tissue necrosis (Riva et al. 2015).

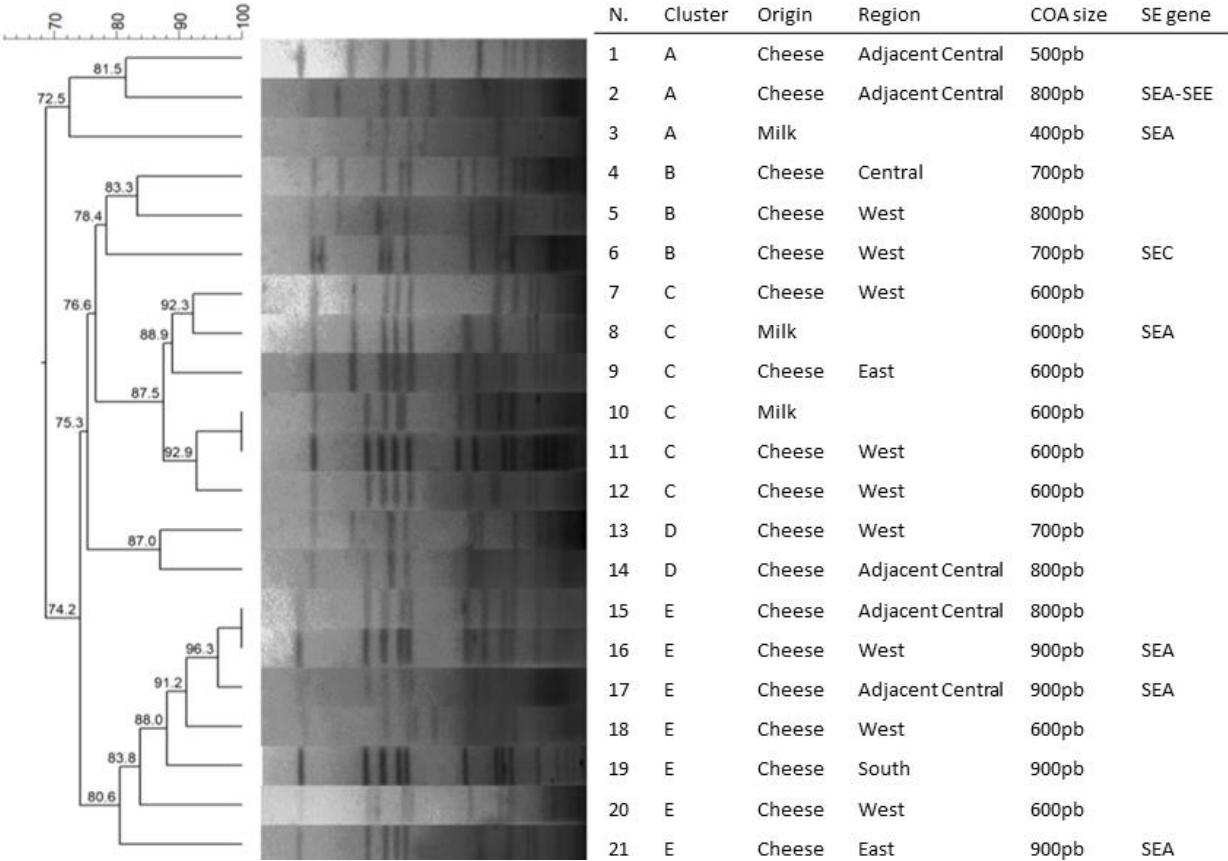
3.5. PFGE analysis

All evaluated characteristics still reveal the need for comprehensive studies on epidemiological profiles. For this, it was used the Pulsed Field Electrophoresis Gel (PFGE) technique recognized as one of the best discriminatory methods for *S. aureus* typing, (considered as gold standard). and has been widely used to outbreaks investigation (Hookey, Richardson & Cookson, 1998).

A random sampling of 33 cheese and milk strains used in this study was performed, with DNA digestion by the *Sma*I enzyme, of which only 21 strains: 18/38 minas fresh cheese samples and 3/55 mastitic milk samples were used to understand the study of the epidemiological profile of *Staphylococcus aureus* of dairy products in the Federal District. Considering PFGE as a gold standard discriminatory methodology for the definition of genotyping in molecular epidemiology, the remainder was classified as non-typeable by the technique.

Among the 21 *S. aureus* isolated from cheese and milk, 19 DNA fingerprint were detected, characterized by the difference DNA fragments, divided into five pulsogroups: Cluster A, with 3 strains; Cluster B, with 3; and Cluster C, with 6, Cluster D, with 2 and Cluster E, with 7 strains that showed, for the most part, genotypic

similarity above 80%, nearby findings were reported in a similar study in Pernambuco, Brazil (Silveira-Filho et al. 2014) (Picture3.1).



Picture3.1: Dendrogram of the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of the *S. aureus* strains from the milk of cattle with subclinical mastitis and minas fresh cheese.

In Cluster A, the first two strains, 1 and 2, were from cheese samples collected from the same administrative region, differing only at the point of purchase (cold house and informal, respectively) presented 81.5% of genetic similarity indicating the possibility from a common ancestor, but only one of them detected virulence for SEA and SEE encodes. However, in the same cluster, the association of the two strains with 3 originating from milk, demonstrated a distant correlation (72.5%) of gene similarity, possibly due to external contamination of the cheese-making process.

Within Cluster B, similar to Cluster A, the genetic similarity pattern detected was 83.3%, all strains derived from cheese from different regions (Central and West), with close COA gene weight, between 700 and 800 bp. Similarly, both strains presented low clonal relationship (78.4%) to the bacteria 6.

Cluster C grouping was the most representative PFGE pattern in which presents greater general proximity in the characterization between bacterial strains, with genetic similarity, up to 87.5%, indicating the same clonal origin. In this cluster, there are 6 strains, 4 from foodborne and 2 from animal origin. The 4 strains from cheese, 3 of them from the informal market and 1 from the supermarket, come from the West (3/4) and East (1/4). All *S. aureus* in this grouping are the same COA amplicon (600bp) (6/6) and only one strain contains SEA (1/6).

This genotypic correspondence between cheese and milk samples suggests the maintenance of pathogens through the production chain from the raw material, and therefore, a probable neglect in pasteurization.

An important point is the presence of the first clone (11 and 10), considered with 100% of genetic homology, contained in cluster C, coming from milk (10) and the other from cheese (11). Whereas the milk sample 10 comes from before 2011, it has at least a 5-year distance between collections. It reflects a temporal positioning in relation to the endurance of this pulsotype, suggesting persistent, intermittent or even endemic infections in the FD properties.

Cluster D is composed of 2 *S. aureus* (13 and 14) dairy products, both obtained in the informal market and proximity to COA segments. They present an 87% similarity gene, indicating the same clonal origin, even belonging to distant regions. In which the same local source of the raw material receipt is suspected.

The last cluster, E, consists only of cheese strains, 15 to 21, commercialize informally (4/7) and in bakeries (3/7). These points of sale are often prone to the commercialization of non-supervised artisanal or local products. Most of them are in the vicinity, West (3/7), while others are geographically distant, South (1/7), East (1/7) and Adjacent Central (2/7), with over 80% gene similarity. Within this pulsogroup is contained the second clone, are strains of cheese, 15 and 16, of the different geographical area

PFGE genotyping reveal the latent possibility of *Staphylococcus aureus* contamination mainly of the animal source when compared to analyzed dairy samples, which may reflect a current scenario of the Federal District, similar results were demonstrated in Goiás (André et al. 2008).

There are several reasons that might corroborate such suspicion, among them, the conformity, in general, in the clonal relationship. Another reason is the characterization of pathogenic strains with analogous genotypic properties in different regions and enterprise types, scattered in the geographic space of the DF. Finally, the presence of a real bacterial clone with a 100% genetic correlation between milk and cheese origin.

Since the cheese collected was either supervised or not, there is a possibility that some of these cheeses were produced with raw milk and were hand-manufactured, so there is a potential of cross contamination between food handlers' hands and raw milk (André et al.2008)

Possibly the clonal group persistence, which are secreted over time, has a high potential for propagation due to particularities that allow internal survive in the gland. The most viable explanations would be due to the virulence factors, or frequent

treatment with antimicrobial drugs, which would result in the elimination of sensitive strains, allowing the persistence of resistant strains (Girardini et al. 2016), which reinforces the need for better food safety control measures.

4. CONCLUSION

The results obtained from this research indicated that *Staphylococcus aureus* from the herd with subclinical mastitis and from Minas fresh cheese showed a wide diversity in the strains population. The predominance of pattern coagulotypes, as 600pb COA amplicon, especially when in the presence of infection, with a high potential to carriage enterotoxins encodes, what make it more dangerous.

The molecular epidemiological study reveals a presence of *S.aureus* of mastitic milk strains in cheese and maintenance of infectious strains in the DF herd for long periods. Which could contribute to an overall manifestation of staphylococcal food poisoning, representing a public health risk.

The information collected in this study can be used to develop food quality control measures for *Staphylococcus aureus*. In addition, it recommends to improve the herd health and design better strategies for safe dairy production.

5. REFERENCES

André, M. C. D., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., Serafini, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. Food Control, v. 19 (2), pp. 200-207, 2008.

Arcuri, E. F., Angelo, F. F., Guimaraes, M. F. M., Talon, R., de Fatima Borges, M., Leroy, S., Montet, D. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. Journal of food protection, v. 73 (12), pp. 2225-2231, 2010.

Brasil, Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12/2001 de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

Can, H.Y., Elmali, M., Karagöz, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, Minced meat, and chicken meat samples. Korean journal for food science of animal resources, v. 37 (2), pp. 175, 2017.

Castañeda-Ruelas, G.M., Soto-Beltrán, M., Chaidez, C. Detecting Sources of *Staphylococcus aureus* in One Small-Scale Cheese Plant in Northwestern Mexico. Journal of food safety, v. 37 (1), pp. e12290, 2017.

CDC-Center for Diseases Control (US), Unified Pulsed--Field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol for Gram Positive Bacteria, 2012.

Chen, Q., Xie, S. Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China. Toxins, v. 11 (6), pp. 307, 2019.

Coelho, S. D. M. D. O., Pereira, I. A., Soares, L. D. C., Pribul, B. R., Souza, M. M. S. D. Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Journal of dairy science, 94(7), pp. 3305-3310. 2011.

Dallal, M. M. S., Khoramizadeh, M. R., Amiri, S. A., Yaraghi, A. A. S., Fard, R. M. N. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates: A study on dairy food products and other foods in Tehran, Iran. Food Science and Human Wellness, v.5(4), pp.186-190, 2016.

Do Carmo, L. S., Dias, R. S., Linardi, V. R., de Sena, M. J., dos Santos, D. A., de Faria, M. E., Heneine, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, v. 19 (1), pp. 9-14, 2002.

Effendi, M. H., Hisyam, M. A. M., Hastutiek, P., Tyasningsih, W. Detection of coagulase gene in *Staphylococcus aureus* from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. *Veterinary world*, v.12(1), pp. 68. 2019.

Fox, E. M., Jiang, Y., Gobius, K. S. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. *International Dairy Journal*, v.84, pp.28-35, 2018.

Gharib, A.A.; Adel Attia, M. A.; Bendary, M. M. Detection of the COA gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by polymerase chain reaction. *International Journal of Microbiological Research*, v. 4 (1), pp. 37-42, 2013.

Girardini, L. K., Paim, D. S., Ausani, T. C., Lopes, G. V., Pellegrini, D. C., Brito, M. A. V., Cardoso, M. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36(10), pp. 951-956. 2016.

He, Y., Xie, Y., Reed, S. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Staphylococcus aureus* isolates. In: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 103-111. 2014.

Hennekinne, J. A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M. L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *Journal of applied microbiology*, v. 94 (2), pp. 321-329, 2003.

Hookey, J. V., Richardson, J. F., Cookson, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of clinical microbiology*, v. 36 (4), pp. 1083-1089, 1998.

Hunt, K., Schelin, J., Rådström, P., Butler, F., Jordan, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. *Dairy Science & Technology*, v.92 (5), pp.487-499. 2012.

Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., Stephan, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of dairy science*, v. 98 (5), pp. 2944-2948, 2015.

Jonas, D., Speck, M., Daschner, F. D., Grundmann, H. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40(5), pp. 1821-1823, 2002.

Jørgensen, H. J., Mørk, T., Rørvik, L. M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 88 (11), pp. 3810-3817, 2005.

Kong, C., Neoh, H. M., Nathan, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins*, v.8(3), pp.72. 2016.

Lancette, G. A., Bennet, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Washington (DC): American Public Health Association. 2001.

Mahmoudi, H., Arabestani, M. R., Mousavi, S. F., Alikhani, M. Y. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. Journal of global antimicrobial resistance, v. 8, pp.41-45. 2017.

Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., Braughton, K. R., Scott, D. P., Gardner, D. J., DeLeo, F. R. Contribution of *Staphylococcus aureus* Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. PLoS ONE. v.1(6), pp.e0158293. 2016.

Mandell, D. Bennett's: Principles and Practice of Infectious Disease. Elsevier Saunders 6th., 2015.

Marcos, J. Y., Soriano, A. C., Salazar, M. S., Moral, C. H., Ramos, S. S., Smeltzer, M. S., Carrasco, G. N. Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the AroA Gene. Journal of clinical microbiology, v.37(3), pp.570-574, 1999.

Marques, V. F., de Souza, M., de Mendonça, E. C., Abreu de Alencar, T., Rocha Pribul, B., Lasagno, M. C., Reinoso, E. B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. Pesquisa Veterinária Brasileira. 33(2):161-170 2013.

McLauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V., O'Neill, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. Journal of food protection, v.63(4), pp.479-488, 2000.

Medeiros, M. I. M. D., Nader Filho, A., Souza, V. D., Melo, P. D. C., Ferreira, L. M., Canalejo, L. M. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. Ciência Animal Brasileira, v.14(1), pp.98-105, 2013.

Nader Filho, A., Ferreira, L. M., Amaral, L. A., Rossi Junior, O. D., Oliveira, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59(5), pp.1316-1318. 2007.

Nunes, M. M. Qualidade microbiológica de alimentos prontos para o consumo no Distrito Federal e avaliação de risco quantitativo da exposição da população brasileira a *Staphylococcus aureus* pelo consumo de queijo minas frescal. 2013.

Pereira, C. T. M., de Oliveira, D. S. V., Veloso, V. S., Silva, S. D. S. P., Santos, L. S., Lima, A. F., dos Santos Soares, M. J. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. Semina: Ciências Agrárias, v.39(5), pp. 1957-1967, 2018.

Quinn, M.E., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. London Wolfe Publishing. 1994; 648p.

Reinoso, E. B.; El-Sayed, A.; Lämmler, C.; Bogni, C.; Zschöck, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiological Research, v. 163(3), pp. 314-322, 2008.

Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Morace, G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: Prevalence, SCC mec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. Journal of food protection, v.78(6), pp.1142-1146. 2015.

Salasia, S. I. O., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D., Prabawati, F. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. Journal of veterinary science, 12(4), pp.353-361. 2011.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J., Zweifel, C., Stephan, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology, 101(2), pp.101–107. 2004.

Sharma, V., Sharma, S., Dahiya, D. K., Khan, A., Mathur, M., Sharma, A. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, v.16(1), pp.65. 2017.

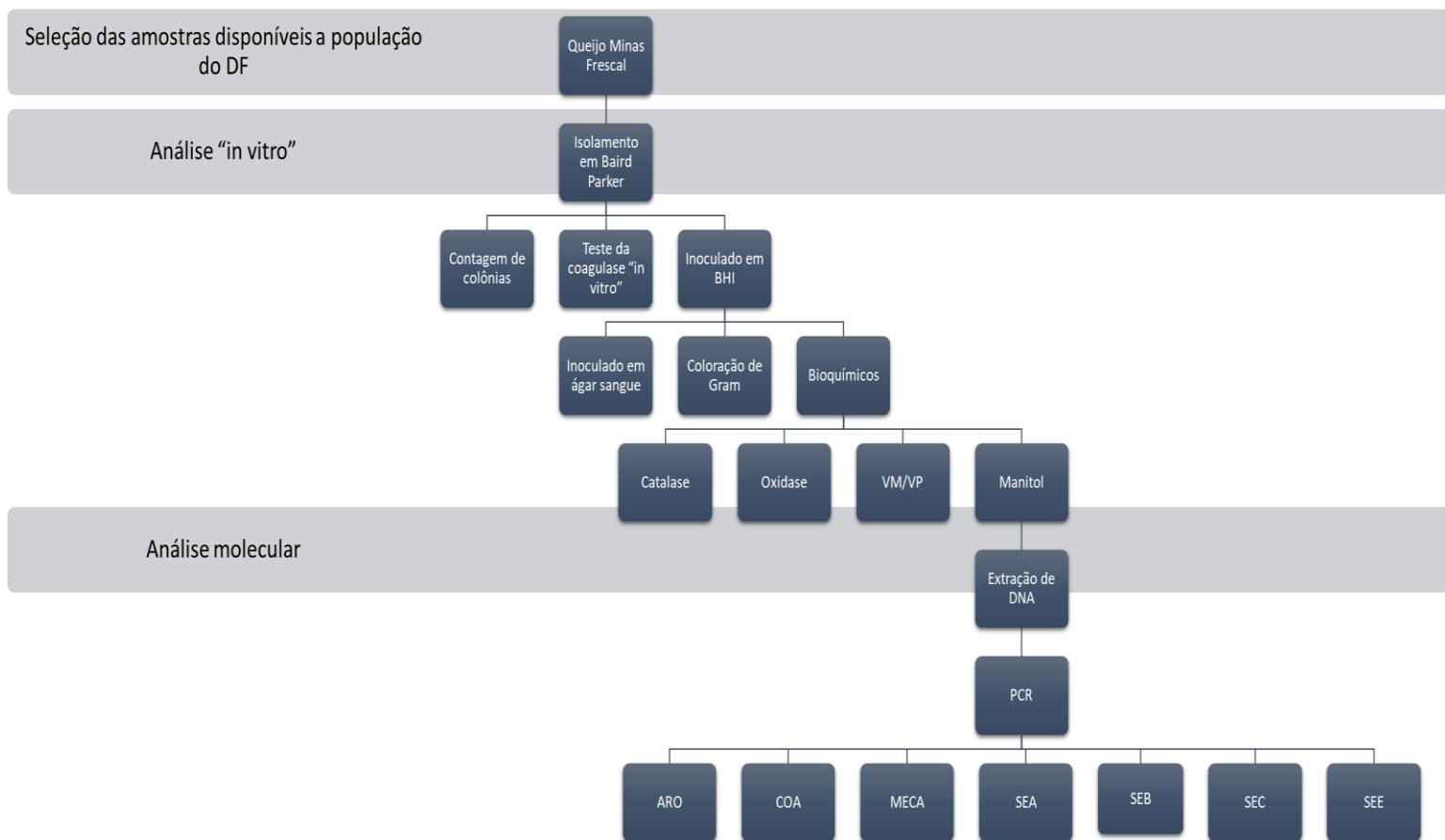
Silveira-Filho, V. M., Luz, I. S., Campos, A. P. F., Silva, W. M., Barros, M. P. S., Medeiros, E. S., Leal-Balbino, T. C Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in northeast Brazil. Journal of food protection, v. 77 (4), pp. 583-591, 2014.

Walcher, G., Gonano, M., Kümmel, J., Barker, G. C., Lebl, K., Bereuter, O., Stessl, B. *Staphylococcus aureus* reservoirs during traditional Austrian raw milk cheese production. Journal of Dairy Research, v. 81 (4), pp. 462-470, 2014.

Wei, H.L.; Chiou, C.S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. Epidemiology & Infection, v. 128 (1), pp. 15-20, 2002.

ANEXO A

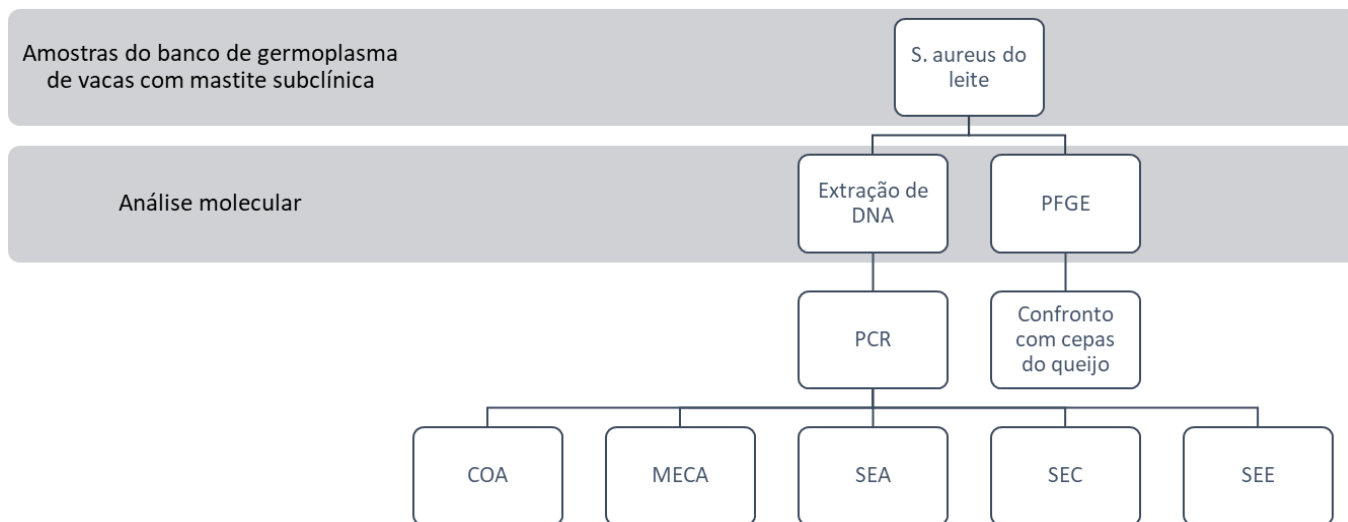
Figura A.1: Fluxograma da metodologia aplicada para as amostras de queijo minas fresco:



ANEXO B

Figura B.1: Fluxograma da metodologia na comparação entre as cepas de *Staphylococcus aureus* do leite de vacas com mastite subclínica/ banco de germoplasma (A) e queijo minas frescal (B):

(A)



(B)

