



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

SARAH PEREIRA DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS
DE QUEIJOS COALHO ARTESANAIS.**

BRASÍLIA, 2023

SARAH PEREIRA DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS
DE QUEIJOS COALHO ARTESANAIS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico, na
Universidade de Brasília, Faculdade de
Ceilândia.

Orientadora: Me. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Co-Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2023

FICHA CARTOGRÁFICA

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

DP436q Pereira da Silva, Sarah
Qualidade microbiológica e resistência antimicrobiana de
bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*
isoladas de queijos coalho artesanais. / Sarah Pereira da
Silva; orientador Leticia Fernandes Silva Rodrigues; co
orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2023.
30 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Qualidade dos alimentos. 2. *Escherichia coli*. 3.
Staphylococcus aureus. 4. Resistência microbiana a
medicamentos. 5. Queijo. I. Fernandes Silva Rodrigues,
Leticia, orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III.
Título.

SARAH PEREIRA DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS
DE QUEIJOS COALHO ARTESANAIS.**

BANCA EXAMINADORA.

Orientadora: Me. Esp. Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade de Brasília)

Farmacêutica Esp. Karolina Oliveira Gomes
(FCE/Universidade de Brasília)

Farmacêutica Carla de Azevedo Bilac
(FCE/Universidade de Brasília)

Farmacêutica Marta Oliveira de Araújo
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois ele nunca me deixou e me permitiu viver esse momento tão feliz.

A minha mãe e minha irmã, Ana e Monique, que nunca me deixaram desistir e foram meu porto seguro durante toda minha vida.

Ao Lucas, que teve muita paciência com meus surtos e me apoiou em todos os momentos.

A minha orientadora, Letícia, por toda sua ajuda e dedicação para que esse trabalho fosse possível e por ter sido luz na minha vida.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que eu me formasse.

RESUMO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo coalho artesanais comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal, assim como, avaliar a resistência antimicrobiana de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas desses queijos. As análises microbiológicas foram: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrótróficos, determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *S. aureus* e pesquisa de *Salmonella spp.* As cepas de *E. coli* e *S. aureus* isoladas dos queijos foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos usando a técnica de disco difusão (técnica de Kirby-Bauer). No total, 88,9% (16/18) das amostras de queijo de coalho estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira por exceder o limite aceitável para coliformes termotolerantes e/ou *S. aureus*, mostrando que queijos de coalho de produção artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal carecem de melhor qualidade sanitária e podem oferecer riscos à saúde do consumidor. A partir das 18 amostras de queijo, foram isoladas 16 cepas *E. coli* e 18 cepas de *S. aureus*. As cepas de *E. coli* apresentaram maior resistência frente aos antimicrobianos sulfonamida (81,25%), cefotaxima (31,25%) e tetraciclina (18,75%), com um total de 25,00% das cepas apresentando perfil de multirresistência (resistência à três ou mais classes de drogas). Contudo, apresentaram elevada sensibilidade ao cloranfenicol (87,50%). As cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência à sulfonamida (77,78%), cefoxitina (66,67%) e tetraciclina (38,89%), além de apresentar um total de 61,11% das cepas multirresistentes. Ainda, apresentaram elevada sensibilidade ao cloranfenicol (94,44%). Destaca-se a importância de estudos como esse que apresentam dados sobre a multirresistência de medicamentos em bactérias isoladas de alimentos de origem animal, evidenciando o provável uso indiscriminado de antimicrobianos em animais como potencial risco de saúde pública.

Palavras-chave: Qualidade dos alimentos; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; resistência microbiana a medicamentos; queijo.

ABSTRACT

This research work aimed to evaluate the microbiological quality of artisanal coalho cheese sold at food markets in the Federal District, as well as to evaluate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria isolated from these cheeses. The microbiological analyzes were: total count of mesophilic and psychotropic microorganisms, determination of the Most Probable Number of total coliforms and thermotolerant coliforms, *S. aureus* count and *Salmonella* spp. Strains of *E. coli* and *S. aureus* isolated from cheeses were subjected to antimicrobial susceptibility testing using the disk diffusion technique (Kirby-Bauer technique). In total, 88.9% (16/18) of the coalho cheese samples were unfit for consumption according to Brazilian legislation for exceeding the acceptable limit for thermotolerant coliforms and/or *S. aureus*, showing that coalho cheese from artisanal production sold in the Federal District lack better sanitary quality and may pose risks to the health of the consumer. From the 18 cheese samples, 16 strains of *E. coli* and 18 strains of *S. aureus* were isolated. The *E. coli* strains showed greater resistance against the sulfonamide antimicrobials (81.25%), cefotaxime (31.25%) and tetracycline (18.75%), with a total of 25.00% of the strains presenting a multidrug resistance profile (resistance to three or more drug classes). However, they showed high sensitivity to chloramphenicol (87.50%). The strains of *S. aureus* showed greater resistance to sulfonamide (77.78%), cefoxitin (66.67%) and tetracycline (38.89%), in addition to presenting a total of 61.11% of multiresistant strains. Still, they showed high sensitivity to chloramphenicol (94.44%). It is important to highlight the importance of studies such as this one, which present data on multidrug resistance in bacteria isolated from foods of animal origin, evidencing the probable indiscriminate use of antimicrobials in animals as a potential public health risk.

Keywords: Food Quality; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; Drug resistance; Cheese.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antimicrobianos e concentrações utilizadas para cepas de <i>E. coli</i>	21
Tabela 2 - Antimicrobianos e concentrações utilizada para cepas de <i>S. aureus</i>	21
Tabela 3 - Análises microbiológicas das amostras de queijos de coalho de produção artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.	22
Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>E. coli</i> isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal.	25
Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>S. aureus</i>	26

LISTA DE SIGLAS

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC/g.	Unidade de formação de colônias por grama
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE QUEIJOS ARTESANAIS E OS PROBLEMAS DE FALTA DE QUALIDADE.....	12
1.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> ISOLADAS DE LEITE E DERIVADOS	13
1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>E. AUREUS</i> ISOLADAS DE LEITE E DERIVADOS	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 JUSTIFICATIVA	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 COLETA DE AMOSTRAS.....	19
4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	19
4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE E ANTIMICROBIANOS	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS DE COALHO DE PRODUÇÃO ARTESANAL COMERCIALIZADOS EM FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO FEDERAL.....	22
5.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> E <i>S. AUREUS</i> ISOLADAS DOS QUEIJOS DE COALHO DE PRODUÇÃO ARTESANAL	24
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas do uso do leite cru na fabricação dos queijos artesanais é a possibilidade da elevada presença de microrganismos patogênicos nos queijos. Inúmeros trabalhos detectaram *S. aureus* em contagens acima do permitido pela legislação brasileira nos queijos artesanais brasileiros (DIAS *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2014). A contaminação do leite cru com *S. aureus* pode ser atribuída a uma higienização deficiente na ordenha, ao uso de água não potável, limpeza inadequada de utensílios e equipamentos e falta de armazenamento do leite a baixas temperaturas (FREITAS; TRAVASSO; MACIE, 2013).

No leite cru, uma importante fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico. A pasteurização do leite é um processo eficiente na destruição de estafilococos. Além do leite, outra via de contaminação dos queijos com *S. aureus* pode ser o manipulador (DIAS *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2014).

S. aureus possui cepas capazes de produzir enterotoxinas que quando pré-formadas e ingeridas com o alimento podem causar intoxicação alimentar (ZOCCHÉ; SILVA, 2012). Uma vez pré-formadas no leite cru, as enterotoxinas poderão permanecer ativas após o processamento do queijo, tendo em vista sua termorresistência (SOUSA *et al.*, 2014).

Os coliformes termotolerantes constituem um subgrupo dos coliformes totais que fermentam a lactose em temperatura de 44,5 a 45,5°C em 24 horas, sendo o principal representante deste grupo a espécie *Escherichia coli* (RODRIGUES; FERREIRA, 2016). O grupo dos coliformes termotolerantes tem sido encontrado com frequência em números elevados em pesquisas envolvendo queijos artesanais. A presença da bactéria *E. coli* nos alimentos indica contaminação direta ou indireta com fezes humanas ou animais, revelando que as condições higienossanitárias serão inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento desses (DIAS *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2014).

Assim, bactérias potencialmente patogênicas como *S. aureus* e *E. coli* podem estar presentes nos queijos de má qualidade e causar doenças transmitidas por alimentos. Essas bactérias podem apresentar resistência a antimicrobianos e, segundo Evangelista-Barreto *et al.* (2016), os microrganismos resistentes podem

transferir genes de resistência para as bactérias presentes no trato gastrointestinal na microbiota humana.

1.1 Produção e consumo de queijos artesanais e os problemas de falta de qualidade

A produção de queijos artesanais no Brasil é uma atividade clássica. Por possuir sabor e texturas características, os queijos artesanais são cada vez mais consumidos por quem procura alimentos nutritivos e saudáveis. O queijo de coalho é um dos principais queijos produzidos artesanalmente em várias regiões do país, estando cada vez mais presente no plano alimentar da população brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Os alimentos artesanais são um produto cultural e economicamente importante cuja tecnologia de fabricação advém do conhecimento transmitido de geração em geração, seguindo uma tradição familiar. Apesar disso, a falta de higiene e produção em ambientes inadequados aumenta o risco de contaminação por microrganismos patogênicos (ARAGÃO *et al.*, 2022). Atualmente, esses alimentos são fabricados principalmente por pequenos produtores, e em menor proporção por grandes empresas de laticínios (MERCHÁN-CASTELLANOS *et al.*, 2018).

O número e os tipos de microrganismos presentes nos queijos dependem de fatores como: a sanidade geral do local de produção, a qualidade da água para lavar os utensílios, condições de manuseio, temperatura e tempo de armazenamento (MERCHÁN-CASTELLANOS *et al.*, 2018). A fabricação artesanal, por pessoas sem treinamento, pode proporcionar a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a qualidade como a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto. Ainda, pelo fato do queijo de coalho não ser maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (FONSECA *et al.*, 2020).

No Brasil, o leite *in natura* nem sempre é de boa qualidade microbiológica, e por esta razão, os queijos artesanais deveriam ser produzidos com leite pasteurizado. A produção de queijo artesanal é comumente realizada a partir de leite

cru, sem nenhum tipo de tratamento térmico prévio. A contaminação microbiológica do leite cru pode ser atribuída a uma higienização deficiente na ordenha, ao uso de água não potável, limpeza inadequada de utensílios e de equipamentos, e falta de armazenamento do leite a baixas temperaturas (DORES; FERREIRA, 2012).

Atualmente, a falta de fiscalização por órgãos oficiais acaba tornando a produção de alimentos artesanais um risco à saúde dos consumidores, ocasionando uma produção que não condiz com a legislação vigente. Vale ressaltar que o queijo artesanal é uma fonte de renda para pequenos produtores que por muitas vezes não possuem instalações adequadas, sendo neste caso, importante que seja feita a aplicação de tecnologia cabível para adquirir os padrões de qualidade exigidos pela legislação vigente (CASTRO *et al.*, 2020).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no ano de 2019 foram identificados 771 casos de doenças alimentares no Brasil, e o consumo de leite e derivados foi o quinto maior causador desses casos. Outro dado importante, foi que a *E. coli*, seguido de *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram os principais agentes etiológicos responsáveis pelos episódios de doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2021).

De acordo com RODRIGUES *et al.*, (2021), os queijos artesanais estão fortemente inseridos na cultura brasileira, o que dificulta a conscientização da população quanto o cuidado ao escolher o local de compra e o processo de fabricação. A exemplo disto estão os queijos artesanais vendidos em fazendas, chácaras e feiras populares que trazem a sensação aos consumidores de um produto fresco e sem riscos, desconsiderando que em sua grande maioria podem ter sido fabricados de forma inadequada, acarretando risco. Contudo, vale destacar que como foi abordado, alguns agricultores não possuem orientação e renda para praticar a fabricação de acordo com a legislação vigente, tornando necessário um incentivo do governo para obtenção das práticas corretas de fabricação, pois se trata de um produto que possui alta suscetibilidade a contaminação microbiológica e sua vida útil está associada com fatores como fabricação, refrigeração ao longo da cadeia produtiva e ausência de um número elevado de microrganismos no leite *in natura*.

1.2 Resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de leite e derivados

Escherichia coli são bactérias comensais do trato intestinal de humanos e de animais, e certas cepas são patógenos zoonóticos. Além disso, as cepas de *E. Coli* são frequentemente usadas para monitorar a resistência antimicrobiana, pois possuem uma grande variedade de hospedeiros e podem facilmente adquirir genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes (JIANG *et al.*, 2019).

Segundo a literatura, observa-se que já existem cepas de *E. coli* presentes em queijos artesanais que apresentam resistência frente aos principais antimicrobianos disponíveis, e diante disso, se faz necessário o monitoramento contínuo da resistência antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas dos alimentos. Rodrigues (2021) relatou que 85,5% das cepas de *E. coli* isoladas de queijos minas frescos artesanais comercializados no Distrito Federal, Brasil, apresentaram resistência as sulfonamidas. Jiang *et al.* (2019) descreveram que a resistência às sulfonamidas vem aumentando mundialmente, principalmente em bactérias Gram-negativas, podendo esta resistência ser compartilhada cromossomicamente, por plasmídeos ou transposons.

Evangelista-Barreto *et al.* (2016) observaram que 50,0% das amostras de queijo coalho e 7,0% das amostras de queijo manteiga estavam contaminadas com *Escherichia coli*. Também foi constatado que as cepas de *E. coli* apresentaram resistência à ampicilina (16,7%) e imipenem (16,7%), apresentando perfil de multirresistência importante. A pesquisa foi feita em Cruz das Almas, Bahia e considerou que os queijos artesanais comercializados na região tinham qualidade insatisfatória para o consumo, já que poderiam facilmente veicular patógenos multirresistentes.

No estado de Minas Gerais foi realizado um estudo sobre a resistência das cepas de *E. coli* encontradas no queijo do tipo muçarela artesanal, e nessa pesquisa foram isoladas 147 cepas de *E. coli*, examinando a resistência frente à 12 antibióticos. Os antimicrobianos com maior relevância considerando a resistência foram: tetraciclina (52,4%), cefalotina (44,2%), amicacina (34,1%), ampicilina (31,3%) e ácido nalidíxico (30,0%). Os autores observaram uma porcentagem elevada de multirresistência, o que compôs um motivo de preocupação devido ao risco de disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos para a microbiota humana (CARDOSO; MARIN, 2014).

1.3 Resistência antimicrobiana de cepas de *S. aureus* isoladas de leite e derivados

Segundo TESFAYE *et al.*, (2021), as cepas de *Staphylococcus* são capazes de produzir uma camada extracelular de exopolissacarídeos envolvendo a parede celular. Essa estrutura capsular tem sido associada ao aumento de virulência contra o mecanismo de defesa do hospedeiro. Vários fatores de virulência atuam juntos no processo patogênico do *S. aureus*. A ampla gama de infecções causadas por *S. aureus* está relacionada a uma série de fatores de virulência que lhe permitem aderir à superfície, invadir ou evitar o sistema imunológico e causar efeitos tóxicos prejudiciais ao hospedeiro. A virulência de *S. aureus* é geralmente considerada multifatorial e devido à ação combinada de vários determinantes de virulência.

Castro *et al.* (2019) descreveram que *S. aureus* é um dos principais agentes patogênicos encontrados em queijos produzidos com leite cru no mundo. Também descreveram que após a análise de 76 cepas de *S. aureus* isoladas de queijos foi possível identificar um perfil de maior resistência para a Penicilina G (67,1%) e Tetraciclina (27,6%). Além disso, as cepas de *S. aureus* apresentaram alta diversidade genética, como a presença de genes que codificam vários fatores de virulência, especialmente exotoxinas como enterotoxinas estafilocócicas, toxina da síndrome do choque tóxico e hemolisina, e houve indícios de que a presença desses micro-organismos no produto final foi proveniente da contaminação do leite cru, do soro-fermento (pingo) e dos manipuladores assintomáticos. O soro-fermento é uma cultura estabilizada termofílica e ácido resistente, composta principalmente de *Lactobacillus*.

Segundo a pesquisa de Rodrigues (2021) realizada com amostras de queijo minas frescal comercializados no Distrito Federal, Brasil, ocorreu alta contagem de *S. aureus* nos queijos artesanais. Do total de 135 cepas de *S. aureus* estudadas, apenas 23 (17,0%) não apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, e 112 cepas (82,9%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Foram identificadas 27 cepas (20,0%) multirresistentes.

Owenga *et al.* (2020) relataram a elevada resistência antimicrobiana de cepas de *S. aureus* isoladas de leites de gado sem pasteurização. O estudo foi realizado na África Oriental e verificou que as cepas tinham maior resistência à tetraciclina (79,0%), ampicilina (58,0%), e oxacilina (33,0%). Aragão *et al.*, (2018),

isolou cepas de *S. aureus* em amostras de queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra no estado de Pernambuco, e também identificou genes de resistência aos β -lactâmicos e genes codificadores de enterotoxinas. O estudo demonstrou que todas as amostras de queijocoalho tiveram valores de *S. aureus* acima do permitido pela legislação vigente, como também, o gene *blaZ*, gene responsável resistência à penicilina, foi detectado em 42,6% dos isolados de *S. aureus*.

Vários estudos relataram a resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* e *S. aureus* isoladas de alimentos. O aumento de doenças ligadas a alimentos junto ao fenômeno da resistência antimicrobiana têm trazido consequências graves à saúde pública, ao restringir as opções terapêuticas, pois, os alimentos podem contribuir para disseminação de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos (BRASIL, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo coalho artesanais comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal, assim como, avaliar a resistência antimicrobiana de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas desses queijos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises microbiológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *S. aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp.;
- Realizar teste de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* e *S. aureus* isoladas dos queijos artesanais utilizando o método de disco-difusão (Kirby-Bauer).

3 JUSTIFICATIVA

O queijo é considerado um alimento saudável, sendo rico em cálcio, gordura, vitaminas e proteínas essenciais para o corpo humano. Por ser muito apreciado é um alimento facilmente encontrado em todo o mundo. No Brasil, as tradições regionais influenciam na forma como esse alimento é fabricado, originando os alimentos de produção artesanal. O alto consumo de queijos de produção artesanal e o frequente uso do leite cru na fabricação desses queijos pode levar a elevada presença de bactérias potencialmente patogênicas nesses alimentos, como é o caso da *E. coli* e *S. aureus*. Assim, estudos como o nosso que se propõe a avaliar a resistência antimicrobiana de bactérias *E. coli* e *S. aureus* isoladas de queijos tipo coalho artesanais comercializados no Distrito Federal são importantes tanto para a saúde do consumidor, quanto para a avaliação da qualidade do tratamento dos animais de ordenha.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de amostras

As amostras de queijo de fabricação artesanal foram coletadas em diferentes feiras permanentes do Distrito Federal. Todas as amostras foram transportadas resfriadas dos locais de estudo para o laboratório no tempo de 30-50 min. e no prazo máximo de 1 hora após a coleta foram iniciadas as análises microbiológicas.

4.2 Análises microbiológicas

Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até 10).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem (Acumedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C \pm 1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a contagem de *S. aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol (Kasvi®). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. As colônias de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Ágar Sal Manitol e submetidas à coloração de Gram.

O método utilizado para determinar os coliformes totais e termotolerantes foi a técnica de Número Mais Provável (NMP). A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra. Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose (HiMedia®). Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h.

A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2,0% (Kasvi®) (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (Kasvi®) (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho- maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g. Para a pesquisa de *E. coli*, as cepas foram isoladas do caldo EC no meio Ágar Mac Conkey.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10⁻¹ das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 mL das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetrionato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar *Salmonella Shigella* (Kasvi®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo os meios bioquímicos: Ágar Três Açúcares e Ferro (Kasvi®), Ágar Lisina Ferro (HiMedia®) e Ágar Fenilalanina (HiMedia®).

4.3 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2020). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Antimicrobianos e concentrações utilizadas para cepas de *E. coli*. (enterobactérias).

Antimicrobianos	Concentração
Amoxicilina* (AMC)	20 +10 µg
Cefotaxima (CTX)	30 µg
Ceftazidima (CAZ)	30 µg
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg
Cloranfenicol (CLO)	30 µg
Gentamicina (GEN)	10 µg
Imipenem (IMP)	10 µg
Sulfonamida (SUL)	300 µg
Tetraciclina (TET)	30 µg

Legenda: *Amoxicilina e ácido clavulânico; µg: micrograma.
Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 2 - Antimicrobianos e concentrações utilizada para cepas de *S. aureus*.

Antimicrobianos	Concentração
Amoxicilina* (AMC)	20 +10 µg
Cefoxitina (CFO)	30 µg
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg
Cloranfenicol (CLO)	30 µg
Eritromicina (ERI)	15 µg
Gentamicina (GEN)	10 µg
Sulfonamida (SUL)	300 µg
Tetraciclina (TET)	30 µg
Vancomicina (VAN)	30 µg

Legenda: *Amoxicilina e ácido clavulânico; µg: micrograma.
Fonte: Autoria própria (2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade microbiológica das amostras de queijos de coalho de produção artesanal comercializados em feiras permanentes do Distrito Federal

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises microbiológicas dos queijos de coalho de produção artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.

Tabela 3 - Análises microbiológicas das amostras de queijos de coalho de produção artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.

Amostras	Bactérias mesófilas* (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas* (log UFC/g)	Coliformes totais† (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes ‡ (log NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp.**	<i>S. aureus</i> (log UFC/g) ***
1	5,82± 0,08	3,69±0,24	3,04±0,00	2,91±0,21	Negativo	4,23±0,40
2	5,92 ±0,05	4,68 ± 0,17	ND	ND	Negativo	4,35 ± 0,10
3	5,87± 0,01	4,58 ± 0,07	3,04± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	4,15 ± 0,20
4	6,06 ±0,26	6,32 ± 0,48	3,04± 0,00	2,51 ± 0,46	Negativo	4,33 ± 0,35
5	7,71 ± 0,17	2,99 ± 0,08	3,04± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	4,25 ± 0,20
6	6,10 ± 0,15	4,13 ± 0,03	2,14 ± 0,54	2,12 ± 0,82	Negativo	4,25 ± 0,20
7	7,47 ± 0,02	3,46 ± 0,31	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	1,33 ± 2,30
8	6,62 ± 0,16	3,31 ± 0,45	2,59 ± 0,48	2,91 ± 0,21	Negativo	ND
9	6,84 ± 0,61	3,48 ± 1,16	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	1,33 ± 2,30
10	7,66 ± 0,11	2,85 ± 2,66	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	ND
11	6,31 ± 1,15	4,08 ± 0,33	2,84 ± 0,33	1,84 ± 0,77	Negativo	1,00 ± 1,70
12	7,33 ± 0,12	6,40 ± 0,11	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	ND
13	5,57 ± 0,21	3,30 ± 0,15	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	4,30 ± 0,20
14	6,63 ± 0,11	4,66 ± 0,10	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	ND
15	6,34 ± 0,26	3,10 ± 0,21	3,04 ±0,00	2,06 ± 0,60	Negativo	4,59 ± 0,00
16	6,78 ± 0,17	5,23 ± 0,25	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	4,30 ± 0,10
17	6,40 ± 0,29	3,93 ± 0,21	3,04 ±0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	ND
18	5,97 ± 0,36	3,93 ± 0,10	2,84 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Negativo	4,00 ± 0,00

Legenda: UFC: Unidade formadora de colônias; NMP: Números mais provável por grama; ND: não detectado. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições.

*Valor de referência: 7,0 log UFC/g (ICMSF, 1986);

†Valor de referência: 3,0 log NMP/g (BRASIL, 1996);

‡Valor de referência: 3,0 log NMP/g (BRASIL, 2019);

** Valor de referência: ausente (BRASIL, 2019);

*** Valor de referência 3,0 log UFC/g (BRASIL, 2019).Fonte: Autoria própria (2023).

Observou-se que 22,2% (4/18) das amostras de queijos de coalho de produção artesanal tiveram valores de bactérias mesófilas acima do valor de referência de 7,0 log UFC/g (ICMSF, 1986). As bactérias mesófilas são responsáveis por fermentar a lactose e produzir ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que reduz o pH do leite. As condições que favorecem o desenvolvimento dessas bactérias estão associadas a falta de higiene no manuseio do leite, principalmente o uso de utensílios que não estão adequadamente limpos, e o não-resfriamento ou o resfriamento inadequado do leite (MARIOTO *et al.*, 2020).

Em relação as bactérias psicrófilas, apesar de todas as amostras deste estudo apresentarem valores dentro do permitido pela ICMS (1986), é importante destacar que esse grupo de bactérias em excesso é responsável pela deterioração dos queijos, com produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas que alteram a composição física do alimento (SAMARZIJA *et al.*, 2012).

Para os coliformes totais, 66,6% (12/18) das amostras estavam com enumeração acima de 3,0 log NMP/g, o que constitui um importante indicador de condições higiênicas insatisfatórias (DIAS *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2015). Em um estudo realizado no norte de Piauí foi constatado que 75,0% dos queijos de coalho analisados apresentaram enumeração elevada de coliformes totais. Tal fator demonstrou higiene insatisfatória nas etapas de produção e/ou armazenamento dos queijos (DIAS *et al.*, 2015).

Foram encontradas 61,1% (11/18) das amostras com enumeração de coliformes termotolerantes acima do aceitável neste estudo. DIAS *et al.* (2015) demonstraram que em relação à contagem de coliformes termotolerantes, 68,7% amostras apresentaram valores que ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação vigente. *Escherichia coli* é o principal representante de grupo dos coliformes termotolerantes (RODRIGUES & FERREIRA, 2016). A presença elevada de bactérias *E. coli* indica contaminação direta ou indireta dos queijos com fezes humanas ou animais, revelando condições sanitárias inadequadas durante o processamento ou armazenamento dos queijos (CHÁVEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2014). Seu elevado percentual no queijo de coalho é um risco para os consumidores, devido algumas cepas serem potencialmente patogênicas (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2016).

Não se detectou *Salmonella* spp. nas amostras de queijos de coalho deste estudo. A contaminação dos queijos por *Salmonella* spp. pode estar relacionada a

diferentes fontes, porém a pasteurização do leite é capaz de eliminá-la, o que aumenta a preocupação deste patógeno poder estar presente nos queijos artesanais fabricados com leite cru (SOUSA *et al.*, 2014).

Observou-se neste estudo que 55,0% (10/18) das amostras de queijos de coalho de produção artesanal estavam fora do limite estabelecido na legislação brasileira para a contagem de *S. aureus*. Em estudos realizados com amostras de queijo de coalho em algumas regiões do Brasil foi constatado uma elevada contagem de *S. aureus*. OLIVEIRA *et al.* (2010) observaram que, de um total de 42 amostras de queijo de coalho comercializadas no município do Cabo de Santo Agostinho (PE), 76,2% (32/42) apresentaram contagens de *S. aureus* acima do aceitável. Em outro estudo, ANDRADE *et al.* (2016) realizaram análises de 300 amostras de queijos de coalho comercializados em Fortaleza-CE, provenientes de 15 marcas (sete artesanais e oito industriais), e obtiveram elevada contagem de *S. aureus* em 100% das amostras de produção artesanal.

No total, 88,9% (16/18) das amostras de queijo de coalho estavam impróprias para o consumo, mostrando que queijos de coalho de produção artesanal comercializados em feiras permanentes do Distrito Federal carecem de melhor qualidade sanitária e podem oferecer riscos à saúde do consumidor.

5.2 Resistência antimicrobiana de bactérias *E. coli* e *S. aureus* isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal

A partir da análise de 18 amostras de queijo, foram isoladas 16 cepas de *E. coli* e 18 cepas de *S. aureus*. O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal está apresentado na Tabela 4 e mostrou maior resistência frente às sulfonamidas (81,3%), cefotaxima (31,3%) e tetraciclina (18,8%).

Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal.

Antimicrobianos	R % (n)	I % (n)	S % (n)
SUL	81,25 (13)	6,25 (1)	12,50 (2)
CLO	12,50 (2)	0,00 (0)	87,50 (14)
CTX	31,25 (5)	12,50 (2)	50,00 (8)
TET	18,75 (3)	0,00 (0)	81,25 (13)
IMP	0,00 (0)	62,50 (10)	37,50 (6)
GEN	12,50 (2)	18,75 (3)	68,75 (11)
AMC	12,50 (2)	0,00 (0)	87,50 (14)
CIP	12,50 (2)	31,25 (5)	56,25 (9)
CAZ	6,25 (1)	31,25 (5)	62,50 (10)

Legenda: R= resistente; I = intermediário; S = sensível;

n = número de cepas e % = porcentagem em relação ao total de 16 cepas

AMC: amoxicilina e ácido clavulânico (20 +10 µg); CTX: cefotaxima (30 µg) ; CAZ: ceftazidima (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); CLO: cloranfenicol (30 µg); GEN: gentamicina (10 µg); IMP: imipenem (10µg); SUL: sulfonamidas (300 µg); TET: tetraciclina (30 µg).

Fonte: Autoria própria (2023).

As cepas de *E. coli* apresentaram elevada resistência frente às sulfonamidas (81,3%). Similar aos resultados obtidos no nosso estudo, RODRIGUES (2021) relatou que 85,5% das cepas de *E. coli* isoladas de queijos minas frescal apresentaram resistência as sulfonamidas. A resistência as sulfonamidas vem aumentando mundialmente, principalmente em bactérias Gram-negativas, podendo esta resistência ser compartilhada cromossomicamente, por plasmídeos ou transposons (JIANG *et al.*, 2019).

As cepas de *E. coli* apresentaram 18,8% de resistência as tetraciclina. O principal mecanismo de resistência bacteriana às tetraciclina ocorre pela diminuição do acesso do antimicrobiano no interior da célula, podendo ocorrer através de três principais mecanismos: por meio das proteínas de proteção ribossomal, pelo efluxo das tetraciclina para fora da célula ou pela inibição enzimática das tetraciclina. Até o momento foram descritos 59 genes de resistência às tetraciclina, os quais são denominados de *tet* e *otr* (MAROSEVIC *et al.*, 2017).

As cepas de *E. coli* tiveram uma boa sensibilidade em relação ao antimicrobiano cloranfenicol (87,5% de sensibilidade). Resultados similares foram reportados no estudo de EVANGELISTA-BARRETO *et al.* (2016) com queijos artesanais na Bahia, onde as cepas de *E. coli* isoladas desses queijos também apresentaram elevada sensibilidade ao cloranfenicol.

As cepas de *E. coli* apresentaram 43,8% de suscetibilidade intermediária e

resistência a ciprofloxacina. Também foi notório o perfil de 62,5% de suscetibilidade intermediária ao imipenem. A resistência de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamases*) às fluorquinolonas apresentam um desafio importante quanto ao protocolo de tratamento e controle de infecções (BHATNAGAR *et al.*, 2019).

Na Tabela 5 é possível observar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal. As cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência às sulfonamidas (77,8%), cefoxitina (66,7%) e tetraciclina (38,9%).

Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isoladas dos queijos de coalho de produção artesanal.

Antimicrobianos	R (%) n	I (%) n	S (%) n
SUL	77,78 (14)	00,0 (0)	22,22 (4)
CFO	66,67 (12)	00,0 (0)	33,33 (6)
CLO	00,0 (0)	5,56 (1)	94,44 (17)
ERI	16,67 (3)	22,22 (4)	61,11 (11)
VAN	-	-	66,67 (12)
CIP	11,11 (2)	33,33 (6)	55,56 (10)
TET	38,89 (7)	11,11 (2)	50,00 (9)
GEN	16,67 (3)	16,67 (3)	66,67 (18)

Legenda: R= resistente; I = intermediário; S = sensível;

n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 18 cepas;

AMC: Amoxicilina e ácido clavulânico (20 +10 µg); SUL: sulfonamidas (300 µg); CFO: cefoxitina(30 µg); CLO: cloranfenicol (30 µg); ERI: eritromicina (15 µg); VAN: vancomicina (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); TET: tetraciclina (30 µg); GEN: gentamicina (10 µg).

Fonte: Autoria própria (2022).

As cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência frente às sulfonamidas (77,8%). Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Rodrigues (2021) que constatou 71,8% de resistência às sulfonamidas em cepas de *S. aureus* isoladas de queijos minas frescal.

As cepas de *S. aureus* mostraram 66,7% de resistência a cefoxitina. Para *S. aureus*, o teste com disco de cefoxitina é comparável ao teste com disco de oxacilina para predizer a resistência a oxacilina *mecA* mediada (MRSA), sendo o teste com disco de cefoxitina mais fácil de ler e, portanto, indicado pelo CLSI (CLSI, 2020). As cepas de *S. aureus* que apresentam resistência às meticilinas devem ser consideradas resistentes a qualquer fármaco da classe dos β-lactâmicos (TESFAYE *et al.*, 2021).

As cepas de *S. aureus* apresentaram 66,7% de sensibilidade a vancomicina. Importante destacar que em nosso estudo não foram relatados resultados sobre a resistência das cepas à vancomicina. Segundo informações disponíveis pelo BRCAS/CAST/EUCAS (2021) a resistência à vancomicina deve ser confirmada por meio do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM), já que este teste é capaz de diferenciar a sensibilidade reduzida à esta droga. Por hora, o método utilizado neste estudo (teste de disco e fusão) não fornece resultados precisos de sensibilidade à vancomicina.

Quanto ao cloranfenicol, 94,4% das cepas apresentaram-se sensíveis a essa droga. Rodrigues (2021) em seu estudo com queijo minas frescal, encontrou 93,3% de sensibilidade das cepas *S. aureus* ao cloranfenicol. Assim, nesses estudos o cloranfenicol se mostrou efetivo contra *S. aureus*.

6 CONCLUSÃO

No total, 88,9% (16/18) das amostras de queijo de coalho analisadas neste estudo estavam impróprias para o consumo, mostrando que esses queijos artesanais comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal carecem de melhor qualidade sanitária e podem oferecer riscos à saúde do consumidor. O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas das amostras de queijo de coalho mostrou maior resistência frente às sulfonamidas (81,3%), cefotaxima (31,3%) e tetraciclina (18,8%). As cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência às sulfonamidas (77,8%), cefoxitina (66,7%) e tetraciclina (38,9%). Tais resultados demonstram a importância do uso racional de antimicrobianos em animais, já que há risco de transferência de genes de resistência para as bactérias presentes no trato gastrointestinal e na microbiota humana, o que pode ocasionar importantes problemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, V. O. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos coalho. **I Congresso Internacional das Ciências Agrárias**, 2016.

ARAGÃO, B. B. *et al.*, Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de resistência aos β - lactâmicos e codificadores de enterotoxinas em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra, Brasil. **Universidade Rural de Pernambuco**, 2018.

ARAGÃO, B. B. *et al.*, Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 84, p. 101785, 2022.

BHATNAGAR, K.; WONG A. The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**. v. 14, n. (11). 2019.

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. **Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global**. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/antibioticosresistencia-de-microrganismos-e-grave-ameaca-saude-global>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Brasília, DF, 2021. Sinan/SVS/Ministério da Saúde. Disponível em: [https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-poralimentos#:~:text=Doen%C3%A7as%20transmitidas%20por%20alimentos%20\(DTA,toxinas%20e%20outros%20parasitas](https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-poralimentos#:~:text=Doen%C3%A7as%20transmitidas%20por%20alimentos%20(DTA,toxinas%20e%20outros%20parasitas). Acesso em: jul 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 07 mar. 1996.

BRCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Versão 11.0, 2021 do EUCAST. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>.

CARDOSO, P.; MARIN, J.M. Resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no Brasil. *Ars Veterinaria*, v.30, n.2, p.104- 108, 2014.

CASTRO, R. C. S. *et al.* Lactic acid bacteria as biological control of *Staphylococcus aureus* in coalho goat cheese. **Food Technology Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 431-

440, 2019.

CASTRO, R. D. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2098-2110, 2020.

CHÁVEZ-MARTÍNEZ A., *et al.* Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 703-710, 2019.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Antiograma – Interpretação das zonas de inibição e concentrações inibitórias mínimas. Edition 2020. **CLSI guideline**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

DIAS, J. N. *et al.* Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo Coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. Viçosa. v.2, n.2, p.26- 34, 2012.

EVANGELISTA-BARRETO *et al.* Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p. 55 — 67, 2016.

FONSECA, G. F., *et al.* Occurrence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in artisanal minas fresh cheeses produced in the rural area of the Baixada Fluminense Region, 96 province of Rio de Janeiro, Brazil. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 9, n. 3, p. 492-503. 2020.

FREITAS. W. C.; TRAVASSO, A. E. R.; MACIE, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho, produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

GARCIA, J.K.S. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.58–65, 2016.

ICMSF. **Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. 2. ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1986. 131p.

JIANG, H., *et al.* Diverse mobile genetic elements and conjugal transferability of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in *Escherichia coli* Isolates from *Penaeus vannamei* pork from large markets in Zhejiang, China. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 1787. 2019.

MAROSEVIC, D., *et al.* Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage — a review. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 24, n. 2, p. 338–344. 2017.

MARIOTO, L. R. M. *et al.* Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrofica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, p. e-44034, 2020.

MERCHÁN-CASTELLANOS, N. A. *et al.* Microorganismos comumente reportados como causantes de enfermidades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**. v. 56, n. 1, p. 171, 2018.

OWENGA, I. *et al.* Antimicrobial usage and detection of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains in raw milk of livestock from Northern Kenya. **Microbial Drug Resistance**, 2020.

RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária – MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 5761, 2016.

RODRIGUES, F. S. L. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos tipo Minas Frescal comercializados no Distrito Federal e determinação da resistência antimicrobiana de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas desses queijos. **Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) - Universidade de Brasília**, 2021.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 75- 95. 2012.

SOUSA, A. Z. B. de *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 3035, 2014.

TESFAYE K., *et al.* Prevalence of mastitis and phenotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in lactating dairy cows of selected dairy farms in and around Adama Town, Central Ethiopia. **Environmental Health Insights**. v. 15, p. 1–8. 2021.

ZOCHE F., SILVA, W. P. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 187-193, 2012.

OLIVEIRA A., *et al.* Qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, 2010.