



UNICEPLAC
CENTRO UNIVERSITÁRIO

Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC
Curso de Medicina Veterinária
Trabalho de Conclusão de Curso

Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*
isolados em amostras de queijo de coalho comercializado
informalmente

Gama-DF
2024

ANA GABRIELA SPINDOLA CUTRIM DE SENA

**Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*
isolados em amostras de queijo de coalho comercializado
informalmente**

Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Orientadora: Prof., Dra. Stefania Marcia de Oliveira Souza.

Gama-DF
2024

ANA GABRIELA SPINDOLA CUTRIM DE SENA

Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de queijo de coalho comercializado informalmente

Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Gama-DF, 11 de novembro de 2024.

Banca Examinadora
Documento assinado digitalmente
 **STEFANIA MARCIA DE OLIVEIRA SOUZA**
Data: 25/11/2024 08:03:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof., Dra. Stefania Marcia de Oliveira Souza.
Orientador

MANUELLA RODRIGUES DE SOUZA MELLO  Assinado de forma digital por MANUELLA RODRIGUES DE SOUZA MELLO
Dados: 2024.11.25 08:07:40 -03'00'

Prof. Me. Manuella Rodrigues de Souza Mello
Examinador

MARGARETI MEDEIROS  Assinado de forma digital por MARGARETI MEDEIROS
Dados: 2024.11.25 09:46:24 -03'00'

Prof., Dra. Margareti Medeiros
Examinador

Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de queijo de coalho comercializado informalmente

Ana Gabriela Spindola Cutrim de Sena¹

Resumo:

O queijo de coalho é um produto típico da região nordestina, amplamente consumido, mas apresenta condições favoráveis para a multiplicação de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, espécie causadora de Infecções Alimentares Estafilocócicas e que se destaca e pela sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos. Este estudo objetivou detectar a presença e avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de *S. aureus* em amostras de queijo de coalho comercializados informalmente. Foram coletadas 10 amostras de queijo de coalho nas feiras do Gama/DF concomitante à aplicação de uma lista de verificação das condições higiênico-sanitárias destes estabelecimentos, permitindo a observação de inconformidades em todas as bancas. As amostras foram submetidas aos procedimentos e testes para isolamento e identificação bioquímica e molecular de *S. aureus*. Nove cepas de *S. aureus* foram confirmadas a partir da PCR para o gene *Nuc*. Estas foram submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, apresentando os seguintes padrões de resistência: 77,77% para amoxicilina com ácido clavulânico, 77,77% para ampicilina, 88,88% para penicilina G, 55,55% para cefoxitina, 33,33% para cefalexina, 55,55% para eritromicina; 88,88% para gentamicina, 100% para polimixina B; 33,33% para sulfametoxazol com trimetoprim; e 77,77% para tetraciclina. Os resultados deste estudo se assemelham com estudos realizados por outros autores. Acredita-se que as inconformidades são devidas à quantidade de amostras avaliadas e às diferenças dos perfis de resistência de cepas de outras regiões. Em suma, é importante que estudos mais extensos sejam realizados para avaliar os impactos destes resultados para a saúde pública.

Palavras-chave: queijo de coalho; *Staphylococcus aureus*; perfil de resistência.

Abstract:

Coalho cheese is a typical product of the Northeastern region, widely consumed, but presents favorable conditions for the multiplication of bacteria such as *Staphylococcus aureus*, a species that causes Staphylococcal Foodborne Poisoning and which stands out for its ability to develop resistance to antimicrobials. This study aimed to detect the presence and evaluate the antimicrobial resistance profile of *S. aureus* in samples of informally marketed coalho cheese. Ten samples of coalho cheese were collected at the fairs of Gama/DF concomitantly with the application of a checklist of the hygienic-sanitary conditions of these establishments, allowing the observation of nonconformities in all stalls. The samples were subjected to procedures and tests for isolation and biochemical and molecular identification of *S. aureus*. Nine strains of *S. aureus* were confirmed by PCR for the *Nuc* gene. These were subjected to antimicrobial susceptibility testing, presenting the following resistance patterns: 77.77% for amoxicillin with clavulanic acid, 77.77% for ampicillin, 88.88% for penicillin G, 55.55% for cefoxitin, 33.33% for cephalexin, 55.55% for erythromycin; 88.88% for gentamicin, 100% for polymyxin B; 33.33% for sulfamethoxazole with trimethoprim; and 77.77% for tetracycline. The results of this study are similar to studies carried

¹Graduanda do Curso Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: gabriela.spindola@hotmail.com.

out by other authors. It is believed that the nonconformities are due to the number of samples evaluated and to the differences in the resistance profiles of strains from other regions. In summary, it is important that more extensive studies be carried out to evaluate the impacts of these results on public health.

Keywords: coalho cheese; *Staphylococcus aureus*; resistance profile.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto versátil utilizado tanto em sua forma fluida, quanto para elaboração de diversos derivados lácteos. A partir do leite são obtidos derivados de aplicação abrangente que podem ser transformados em alimentos salgados, doces ou até mesmo em uma refeição completa. O queijo é um dos derivados lácteos mais importantes dentro da produção leiteira no mundo. De acordo com a FAO (2024), em 2023 foi alcançado o recorde de 3,6 milhões de toneladas de queijo exportadas no mundo. Somente o Brasil foi responsável pela produção de cerca de 7,7 mil toneladas de queijo neste mesmo ano, sendo superado apenas pela União Europeia, pelos Estados Unidos e pela Rússia (USDA, 2024).

Segundo Vigne (2011), o leite passou a ser explorado aproximadamente durante o período Neolítico, entre 10.000 e 3.000 a.C. na região do Oriente Médio. Evidências mostram que a domesticação de cabras, ovelhas e vacas pode ter sido estimulada para obtenção do leite, a qual só seria possível em animais em cativeiro. De acordo com Kindstedt (2018), os fazendeiros neolíticos conservavam os laticínios como estratégia de subsistência, deixando rastros de gordura em cacos de cerâmica. Apesar deste fato não indicar diretamente a ocorrência de fabricação de queijos, estudos demonstram que este é um indicador de produtos lácteos concentrados, bem como o queijo. Outras descobertas confirmam que estes fazendeiros utilizavam peneiras de cerâmica para fabricação de queijo, corroborando com a tese da ocorrência de queijo ainda no período Neolítico (Kindstedt, 2018).

Embora não se saiba como eram os queijos neolíticos, acredita-se que eram mais simples, tendo evoluído através do desenvolvimento de novas técnicas de produção e conservação. Kindstedt (2018) levanta a hipótese de que o abate de animais lactentes pode ter auxiliado no surgimento de queijo coagulado com coalho devido a possibilidade de os produtores observarem a capacidade de coagulação do leite no conteúdo estomacal destes animais. O autor afirma que a partir deste momento a produção de queijo evoluiu significativamente em direções distintas, levando ao surgimento dos diversos tipos de queijos que são conhecidos nos dias atuais.

O queijo de coalho ou queijo coalho, produto amplamente consumido atualmente, é um queijo típico da região Nordeste do Brasil. Este alimento faz parte das tradições gastronômicas da região nordestina, sendo utilizado como ingrediente de diversas comidas típicas, como a tapioca, o baião de dois, a pamonha e os espetinhos que podem ser servidos como aperitivos em churrascos ou outras ocasiões (Cavalcante, 2017). O produto é definido pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março

de 2017 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como:

O queijo que se obtém por meio da coagulação do leite pasteurizado com coalho ou com outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, com a obtenção de uma massa dessorada, semicozida ou cozida, submetida à prensagem e secagem (Brasil, 2017).

O queijo de coalho, assim como os demais derivados lácteos, apresenta condições ideais para a multiplicação de bactérias devido ao seu alto valor nutricional, especialmente quando se trata de produtos elaborados a partir do leite cru. Algumas dessas bactérias presentes neste alimento podem ter potencial para causar enfermidades chamadas de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Uma das principais bactérias causadoras de DTAs por via dos derivados lácteos é *Staphylococcus aureus*, microrganismos com potencial de causar Intoxicações Alimentares Estafilocócicas (SFP, do inglês *Staphylococcal Foodborne Poisoning*) e a Síndrome do Choque Tóxico (TSS, do inglês *Toxic Shock Syndrome*) (Benkerroum, 2017; FAO, 2013; Mcvey, Kennedy, Chengappa, 2016, p. 189).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, catalase-positiva, formadoras de agregados celulares em formato semelhante à de cachos de uva. O *S. aureus*, contrariamente à maioria das espécies de *Staphylococcus*, é coagulase-positiva, fator de virulência relacionado com a patogenicidade destes microrganismos e que auxilia na identificação deste em amostras. Coagulase é uma enzima capaz de ativar a protrombina que converte o fibrinogênio plasmático em fibrina, promovendo a formação de trombos. A produção de coagulase por *S. aureus* também está associada à sua defesa contra células fagocíticas através da deposição de fibrina (Procop, 2018, p. 687-750; Quinn et al., 2018, p. 36-37). Outro fator de virulência associado a *S. aureus* é sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, o que tem reduzido a eficiência de diversos desses fármacos e tem sido motivo de preocupação para a saúde pública (Foster, 2017)

A ocorrência de *S. aureus* em queijos e outros derivados lácteos está associada aos manipuladores, sendo estes a principal fonte de contaminação dos alimentos; e à utilização de leite cru oriundo de animais com mastite bacteriana como matéria-prima. *S. aureus* é uma causa importante de mastite em vacas lactantes que podem eliminar abundante quantidade do microrganismo no leite. A prevenção de *S. aureus* nos queijos se dá pelo controle de mastite, pela pasteurização do leite a ser utilizado e pela correta aplicação das Boas Práticas (Baran et al., 2017; FAO, 2013; Fox et al., 2017, p. 105-120).

Estabelecimentos industriais e varejistas garantem a inocuidade dos alimentos através de seus registros no serviço oficial de inspeção. Nesse quesito, o problema encontrado é a existência de estabelecimentos informais, que, por não serem fiscalizados, podem contar com comerciantes com pouco conhecimento sobre manipulação de alimentos, além de poderem comercializar, em condições precárias, produtos oriundos de leite cru ou de leite mastítico. O consumo de queijo, em especial o de coalho por ser amplamente comercializado informalmente, oriundo destes estabelecimentos clandestinos pode ocasionar a ocorrência das SFP, sendo, portanto, um desafio significativo para a saúde pública (Brasil, 2017; Brasil, 2024; Matos et al., 2015).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo detectar a presença de *Staphylococcus aureus* e avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos em amostras de queijo de coalho comercializados informalmente na região do Gama/DF.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras

Para realização do estudo foram coletadas 10 amostras de queijo de coalho em feiras na Região Administrativa do Gama no Distrito Federal. Foi adquirido, na condição de consumidor, uma fração de queijo em cada banca comercializadora de queijo nas feiras. As amostras foram depositadas em frascos coletores devidamente identificados com o número da amostra, que corresponde à ordem da coleta, e transportados para o Laboratório de Microbiologia Médica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília em caixas isotérmicas com gelo gel.

No momento da coleta foi realizada uma avaliação dos aspectos higiênico-sanitários através da aplicação de uma lista de verificação (Apêndice A) baseadas nas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 275, de 21 de outubro de 2002 e nº 216, de 15 de setembro de 2004, ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tratam da regulação técnica das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e das Boas Práticas para serviços de alimentação, respectivamente. A aplicação da lista de verificação foi efetuada a partir da observação visual, objetivando a avaliação das condições higiênico-sanitárias na comercialização do objeto de estudo.

2.2 Isolamento microbiológico

Cada uma das amostras foi submetida a colheita de material com um auxílio de um *swab*. O material foi inoculado imediatamente em placa de Petri contendo ágar-sangue de carneiro a 7%

(Kasvi®) e levado para incubação à 55°C por 24 horas. Após este período foram preparados esfregaços de acordo com Brasil (2013a) para serem corados pelo Gram para observação morfológica e para classificação das bactérias.

As amostras que apresentaram crescimento de cocos Gram-positivos foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar sal manitol (Acumedia®) e incubadas à 55°C por 24 horas. O ágar sal manitol é um meio de cultivo que, por conter alta concentração de sal, inibe o crescimento de microrganismos, isolando bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. A partir deste meio também é possível verificar a capacidade de fermentação do manitol, a qual caracteriza *S. aureus*. Isso é possível devido ao vermelho de fenol, um indicador de pH que indica reação positiva quando o meio se torna amarelo (Brasil, 2013b).

Após o período de incubação em ágar sal manitol, amostras em que foram verificadas em inspeção visual e em microscopia de esfregaço a possibilidade de existência de mais de uma espécie de bactéria, foram inoculadas novamente em ágar-sangue de carneiro a 7%, utilizando a técnica de semeadura por esgotamento, e incubadas à 55°C por 24 horas. A técnica de semeadura por esgotamento tem como objetivo obter colônias puras e isoladas e consiste em flambar e esfriar a alça a cada mudança de direção na semeadura (Silva et al., 2017, p. 94).

Com a obtenção de culturas puras, estas foram enumeradas aleatoriamente em algarismos romanos precedidas do número da amostra a qual pertenciam e da letra “C” para serem utilizadas nos procedimentos de identificação bioquímica das espécies de bactérias objetivando a detecção de *S.aureus*.

2.3 Provas bioquímicas

Colônias com morfologia compatível com *Staphylococcus* spp., ou seja, que se apresentaram como cocos Gram-positivos na coloração de Gram, foram submetidas aos testes de catalase, OF (oxidação/fermentação de glicose) e coagulase.

2.3.1 Teste de catalase

O teste de catalase consistiu em colocar uma alça de colônias em contato com uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas indica que a bactéria é catalase-positiva, sendo a reação esperada para *Staphylococcus* spp. (Brasil, 2013b). Este teste, por ser mais rápido de

ser realizado, foi o primeiro teste de triagem. Colônias catalase-negativa foram descartadas e não foram submetidas aos demais testes.

2.3.2 Teste de OF

O teste de OF é utilizado para diferenciar bactérias que utilizam glicose por oxidação ou por fermentação. O teste foi realizado em meio Hugh e Leifson (Biolog®) e resumiu-se em inocular dois tubos, um com e outro sem óleo mineral, e incubar a 55°C entre 24h a 15 dias. O resultado é lido a partir da mudança de coloração do meio. Bactérias que não utilizam a glicose apresentam ambos os tubos sem alteração na coloração, permanecendo verdes. Já bactérias que oxidam a glicose apresentarão o tubo com óleo mineral com coloração amarela, enquanto as que fermentam a glicose apresentarão os dois tubos com coloração amarela. *Staphylococcus* spp. fermentam glicose, portanto irão apresentar ambos os tubos com coloração amarelada (Oliveira, 2000).

2.3.3 Teste de coagulase

O teste de coagulase foi realizado em tubo com plasma de coelho reconstituído (Newprov®). Foi adicionado 0,5mL do plasma reconstituído em um microtubo Eppendorf e em seguida foi inoculada uma alçada da colônia. Os tubos foram incubados em estufa a 55°C por 24h. Segundo Brasil (2013b), a interpretação de um resultado positivo é feita a partir da observação da formação de coágulo ao inclinar o tubo após o período de incubação.

2.4 Provas moleculares

As colônias de bactérias com resultados das provas bioquímicas compatíveis com *Staphylococcus* spp. foram submetidas à extração de DNA pelo método de fervura a partir dos isolamentos em ágar-sangue de carneiro. Alçadas de colônias foram adicionadas em microtubos contendo 200 µL água ultrapura e, em seguida, foram homogeneizadas pelo vórtex. Os tubos foram incubados em banho-maria por 15 minutos a 80°C para serem, posteriormente, centrifugados a 1200 rpm em centrífuga refrigerada por 10 minutos a 4°C. Após esse tempo, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro tubo para ser submetido a PCR.

As amostras foram renumeradas em ordem crescente precedidas pela letra “A” para serem utilizadas para preparo de reação da PCR para detecção dos genes de coagulase (*Coa*) e termonuclease (*Nuc*). Foram considerados como *S. aureus* todas as amostras positivas para o gene

Nuc, independente do resultado para o gene *Coa*, devido à sua especificidade para esta espécie (Woongboot et al., 2013). As reações foram preparadas para ambos os genes com 2µL do DNA extraído, 6,5µL de água ultrapura; 12,5µL de Master mix de DNA polimerase termoestável (2x, Cellco Biotec®); 2µL de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*), sendo para *Coa* F: (5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3') e R: (5'- GCT TCC GAT TGT TCG ATG C -3'), e para *Nuc* F: (5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3') e R: (5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA GC-3') Após o preparo das reações, estas foram levadas ao termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems®). Para o gene *Coa* reação consistiu em um ciclo de 94°C por 1 minuto; 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 70°C por 1 minuto; e um ciclo de 72° C por 2 minutos. Quanto ao gene *Nuc*, o segundo estágio da reação se diferencia apenas pelo ciclo de 94°C que, neste caso, é de 1 minuto. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados utilizando corante intercalador de DNA superior (SYBR®Green) para detectar ampliações.

2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado através do método de disco-difusão (BrCAST, 2024a) para todas as amostras identificadas como *S. aureus*, com inoculação inicial em caldo Mueller Hinton (Ionlab®) e incubados em estufa a 55°C até a obtenção de uma suspensão com um padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland. Em seguida as suspensões foram inoculadas nas placas de ágar Mueller Hinton (Kasvi®) com *swab*. Foram distribuídos na superfície da placa os seguintes discos de antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulanato (30µL), ampicilina (10µL), cefalexina (30µL), cefoxitina (30µL), eritromicina (15µL), gentamicina (10µL), penicilina G (10µL), polimixina B (300µL), sulfametoxazol com trimetropim (25µL), e tetraciclina (30µL). As placas foram incubadas em estufa a 55°C por 24 horas e, após este tempo, foram realizadas as leituras. Os resultados obtidos foram classificados em sensível ou resistente de acordo com a tabela de pontos de corte do BrCAST (2024b). Visto que é orientado que isolados resistentes à cefoxitina sejam considerados resistentes à todas as penicilinas, algumas cepas com diâmetros de halo descritos como sensíveis para as penicilinas testadas, foram classificados como resistentes para estas. Ademais, apenas o antimicrobiano sulfametoxazol com trimetropim possui classificação de intermediário de acordo com a classificação utilizada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Lista de verificação

A partir da aplicação da lista de verificação foi possível constatar não conformidades em todas as bancas analisadas. Feiras com instalações permanentes apresentaram melhores condições de comercialização devido à existência de pisos e paredes revestidos de material impermeável e lavável. Ademais nestes locais há a possibilidade de instalação de lavatórios destinados à higiene pessoal. Já as bancas localizadas em feiras livres, a comercialização é realizada em bancadas de madeira e não há lavatórios, portanto, as condições das instalações são, de forma geral, mais inadequadas. Entretanto, foram observadas em todas as bancas problemas relacionados aos manipuladores dos alimentos. Foi verificado ausência de uniformes, de acessórios para proteção dos cabelos, utilização de adornos e presença de unhas compridas e com esmalte. Em 100% das bancas não foi observado a lavagem das mãos antes e após a manipulação, porém não foi verificada o contato direto da pele do manipulador com o alimento, haja visto que a manipulação era realizada com sacos plásticos, filme de PVC ou com facas. Em 100% das bancas, os queijos eram mantidos em temperatura ambiente, porém em 8 delas eram mantidos cobertos com filme de PVC. Apenas em 5 bancas foi observado o armazenamento em local organizado a fim de garantir proteção do alimento contra contaminantes.

3.2 Isolamento de *Staphylococcus aureus*

Acerca dos testes para identificação de *S. aureus*, a Tabela 1 descreve os resultados dos testes bioquímicos realizados em colônias isoladas com morfologia compatível com *Staphylococcus* spp. A partir das 10 amostras de queijo de coalho, foram isolados 16 cocos Gram-positivos, entre eles dois demonstraram ser catalase-negativa, portanto, foram descartados. Quanto às demais colônias, todas se apresentaram como fermentadoras de glicose no teste de OF, porém apenas 5 demonstraram coagulase-positiva no teste de coagulase. Os resultados apontaram 14 colônias com testes bioquímicos em conformidade com os resultados esperados para *Staphylococcus* spp.

Dos 14 cocos Gram-positivos, catalase-positiva e fermentadores de glicose, 9 colônias foram positivas para o gene *Nuc* e entre estas, 8 foram positivas para o gene *Coa* (Tabela 2), revelando uma frequência de 89% do gene *Coa* em amostras positivas para o gene *Nuc*. Este resultado está em consonância com o estudo realizado por Moghassem et al. (2015), que relatou

uma frequência de 90% do gene *Coa* em *S. aureus* isolados em alimentos com resultados positivos para o gene *Nuc*.

Tabela 1 – Resultado dos testes bioquímicos

Colônia	Catalase	OF	Coagulase
C1	+	Fermentativo	+
C2	+	Fermentativo	+
C3	+	Fermentativo	–
C4I	+	Fermentativo	–
C4II	+	Fermentativo	+
C4III – A	–	NR	NR
C4III -B	+	Fermentativo	+
C5I	+	Fermentativo	–
C5II	+	Fermentativo	+
C5III	+	Fermentativo	–
C6	+	Fermentativo	–
C7	+	Fermentativo	–
C8	–	NR	NR
C9I	+	Fermentativo	–
C9II	+	Fermentativo	–
C10	+	Fermentativo	–

NR = não realizado

No que se refere aos resultados negativos para o teste de coagulase, mas positivos para a PCR do gene *Coa*, estima-se que o falsos negativos são devido a produção de estafiloquinase, uma enzima produzida por estafilococos que dissolve os coágulos após incubação prolongada (Fader, 2021, p. 269). Acerca da amostra A2, que se apresentou como coagulase-positiva no teste de coagulase e negativo para gene *Coa*, supõe-se que trata-se de um falso positivo para o teste de coagulase em tubo, resultado relatado também por Kateete et al. (2010).

A contaminação por *S. aureus* pode ocorrer em diferentes momentos da produção do queijo, podendo ocorrer, inclusive, no momento da ordenha ou devido às mastites bacterianas subclínicas (FAO, 2013). Um estudo realizado por Borges et al. (2008) que avalia a contaminação por *Staphylococcus* spp. na matéria-prima e no próprio queijo de coalho, identificou elevados níveis de contaminação por *Staphylococcus* coagulase-positiva no leite cru e no queijo de coalho finalizado em alguns lotes analisados, porém não detectou sua presença no leite pasteurizado e na

coalhada, indicando recontaminação mesmo após o tratamento térmico relacionada a falhas nas BPF.

Tabela 2 – Resultado das provas moleculares e associação com o teste de coagulase

Amostra	Colônia	Teste de coagulase	PCR	
			Gene <i>Coa</i>	Gene <i>Nuc</i>
A1	C1	+	+	+
A2	C2	+	–	+
A3	C3	–	–	–
A4	C4I	–	+	+
A5	C4II	+	+	+
A6	C4III -B	+	+	+
A7	C5I	–	–	–
A8	C5II	+	+	+
A9	C5III	–	+	+
A10	C6	–	+	+
A11	C7	–	+	+
A12	C9I	–	–	–
A13	C9II	–	+	–
A14	C10	–	–	–

A contaminação por *S. aureus* também pode ocorrer através dos manipuladores ou das superfícies ambientais, estando, nestes casos, estritamente relacionada às condições higiênicas-sanitárias da elaboração ou da comercialização do produto (Baran et al., 2017). As não conformidades observadas na aplicação da lista de verificação evidenciam falhas nas boas práticas que podem ter correlação com a detecção de *S. aureus* em 60% das amostras de queijo de coalho coletadas.

3.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos estão sumarizados na Tabela 3. As cepas indicaram os seguintes perfis de resistência: 77,77% para amoxicilina com ácido clavulânico, 77,77% para ampicilina, 88,88% para penicilina G, 55,55% para cefoxitina, 33,33% para cefalexina, 55,55% para eritromicina; 88,88% para gentamicina, 100% para polimixina B; 33,33% para sulfametoxazol com trimetropim; e 77,77% para tetraciclina.

Todas as cepas testadas apresentaram resistência para ao menos uma das penicilinas utilizadas. As penicilinas pertencem ao grupo dos β -lactâmicos, caracterizados pela capacidade de interferir na síntese da parede células das bactérias. Estes fármacos são conhecidos pela sua baixa toxicidade e alta eficácia, porém devido ao seu uso indiscriminado, o desenvolvimento de resistência pelas espécies bacterianas tem limitado sua utilização (Whalen, Finkell, Panavelil, 2016, p. 483-485). De acordo com BrCAST (2024) a maioria dos *S. aureus* são produtores de penicilases (β -lactamases), característica que contribui para a perda da capacidade bactericida destes antimicrobianos e que se relaciona com o perfil de resistência encontrado neste estudo para este grupo de fármacos.

Tabela 3 – Perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados

Antimicrobianos	Nº de amostras	Susceptibilidade [nº (%)]		
		Sensível	Intermediária	Resistente
Penicilinas				
Amoxicilina + Ac. Clavulanato		2 (22,22%)	-	7 (77,77%)
Ampicilina		2 (22,22%)	-	7 (77,77%)
Penicilina G		1 (11,11%)	-	8 (88,88%)
Cefalosporinas				
Cefoxitina		4 (44,44%)	-	5 (55,55%)
Cefalexina		6 (66,66%)	-	3 (33,33%)
Macrolídeos				
Eritromicina	9	4 (44,44%)	-	5 (55,55%)
Aminoglicosídeos				
Gentamicina		1 (11,11%)	-	8 (88,88%)
Polipeptídicos				
Polimixina B		0	-	9 (100%)
Sulfonamidas				
Sulfametoxazol + Trimetropim		5 (55,55%)	1 (11,11%)	3 (33,33%)
Tetraciclinas				
Tetraciclina		2 (22,22%)	-	7 (77,77%)

Foram identificadas 55,55% das cepas resistentes à cefalexina (primeira geração) e 33,33% sensíveis à cefoxitina (segunda geração). As cefalosporinas também são β -lactâmicos, entretanto, são frequentemente mais resistentes às penicilinas. (Ritter, 2020, p. 665). Baseado no descrito

por Whalen, Finkell, Panavelil (2016, p. 489-491), supõe-se que o padrão de resistência maior para cefalexina em comparação ao para cefoxitina é devido as cefalosporinas de primeira geração serem mais resistentes às β -lactamases estafilocócicas, visto que não foram encontrados relatos de cepas de *S. aureus* isoladas em derivados lácteos e submetidas a testes de susceptibilidade antimicrobiana com utilização das cefalosporinas avaliadas.

A eritromicina é pertencente ao grupo dos macrolídeos, compostos que impedem a síntese proteica bacteriana por meio da ligação à uma subunidade do ribossomo do microrganismo. Este composto tem espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, inclusive contra *Staphylococcus* spp. resistentes aos β -lactâmicos, assim como as cepas isoladas neste estudo (Spinosa, 2023, p. 576-586). Apesar desta característica, foram observadas 55,55% das cepas resistentes para eritromicina, em contraste com o analisado por Kayili e Sanlibaba (2020), Gajewska, Wierzchowska-Chajecka e Zadernowska (2022) e Liu et al. (2017), os quais encontraram incidências à eritromicina de 23,35%, 30%, 46,4% respectivamente.

Os aminoglicosídeos são compostos bactericidas, em oposição à maioria dos antimicrobianos que interferem na síntese proteica dos microrganismos. Estes agentes são amplamente utilizados para tratamentos de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, porém causam efeitos tóxicos e deixam resíduos em produtos de origem animal (Spinosa, 2023, p. 570-574). Visto que o presente estudo verificou que apenas uma cepa isolada manifestou sensibilidade à gentamicina, este resultado assemelha-se com o observado por um estudo realizado por Prabakusuma et al. (2022) em *S. aureus* isolados em queijos no sudoeste de China. O autor verificou que 100% das cepas apresentaram resistência ao antimicrobiano em questão.

As polimixinas são fármacos que possuem capacidade de romper a membrana celular bacteriana externa. Eles têm seu uso limitado devido sua toxicidade e não são utilizados para tratamento de infecções causadas por *S. aureus* em razão da sua habilidade de crescer na presença deste antimicrobiano (Ritter, 2020, p. 665-666; Silva, 2017, p. 169). Esta característica é confirmada nesse estudo pelo o perfil de resistência verificado de 100% das cepas resistentes à polimixina B.

Referente às sulfonamidas, compostos que funcionam como bacteriostáticos e bactericidas a depender da concentração administrada, o perfil de resistência observado (33,33%) é compatível com o Prabakusuma et al. (2022), que verificou resistência ao sulfametoxazol com trimetropim em 34,78% das cepas isoladas. Entretanto, o perfil de sensibilidade analisado pelos autores encontra-

se moderadamente abaixo do observado neste estudo, em virtude de uma das cepas (11,11%) ter apresentado susceptibilidade intermediária ao fármaco.

As tetraciclinas são antimicrobianos classificados como de amplo espectro, frequentemente utilizados para tratamento de infecções em rebanhos bovinos em virtude de seu baixo preço (Liu et al., 2017). Este estudo observou incidência de resistência à tetraciclina (22,22%) significativamente menor que Kayili e Sanlibaba (2020) as quais encontraram apenas 5,88% de cepas resistentes ao antimicrobiano em questão. Em oposição, Prabakusuma et al. (2022) obtiveram resultados semelhantes aos dados deste experimento, com 21,74% de cepas resistentes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa maneira, nota-se que a comercialização informal de queijo de coalho na região do Gama/DF está fora dos padrões estabelecidos pelas legislações dos órgão competentes. Esta situação coloca os produtos em risco de contaminação por microrganismos, incluindo *S. aureus*. Para avaliar a relação entre as condições da comercialização informal e a presença do microrganismo avaliado, são necessários estudos mais extensos, os quais devem analisar diferentes pontos durante a elaboração dos produtos.

Em suma, as cepas de *S. aureus* isoladas a partir das amostras coletadas demonstraram alguns perfis de resistência a antimicrobianos semelhantes aos estudos observados. Estima-se a diferença entre os perfis de resistência é em virtude do número de bactérias testadas, visto que o presente estudo foi realizado com poucas amostras em comparação aos estudos avaliados. Outra hipótese é que cepas de outras regiões apresentem perfil de resistência diferentes dos observados no Brasil. Por fim, é importante que estudos futuros realizados no Brasil avaliem os impactos para os consumidores e para a saúde pública da resistência a antimicrobianos de *S. aureus* isolados em queijos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAN, A. et al. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. **Turkish Journal of Nature and Science**, Erzurum, v. 6, n. 2, p. 100-105. 2017. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/384781>. Acesso em: 16 set. 2024.

BENKERROUM, N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 12, p. 1943-1970. 2018. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/ref/10.1080/10408398.2017.1289149?scroll=top>. Acesso em: 2 set. 2024.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: Presidência da República, 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>. Acesso em: 27 ago. 2024.

BRASIL. **Microbiologia clínica para controle de infecção relacionada à assistência à saúde: Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final**. 2 ed. Brasília: ANVISA, 2013. Livro eletrônico. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-4-procedimentos-laboratoriais-da-requisicao-do-exame-a-analise-microbiologica-e-laudo-final>. Acesso em: 17 set. 2024.

BRASIL. **Microbiologia clínica para controle de infecção relacionada à assistência à saúde: Módulo 6 - Detecção e identificação e bactérias de importância médica**. 2 ed. Brasília: ANVISA, 2013. Livro eletrônico. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-6-deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica>. Acesso em: 17 set. 2024.

BRASIL. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. ANVISA. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de setembro de 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html. Acesso em: 03 set. 2024.

BRASIL. **Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. ANVISA. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de outubro de 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/anexos/anexo_res0275_21_10_2002_rep.pdf. Acesso em: 03 set. 2024.

BRASIL. **Serviço de Inspeção Federal (SIF)**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif>. Acesso em 16 set. 2024.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). **Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos do BrCAST-EUCAST**. 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-6/>. Acesso em: 15 out. 2024.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). **Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. 2024. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-6/>. Acesso em: 15 out. 2024.

BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1431-1438, ago. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/fhgjgdChHty9wpYsCrkrzvm/#>. Acesso em: 21 out. 2024.

CAVALCANTE, J. F. M. **Queijo coalho artesanal do Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil S.A., 2017. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/690>. Acesso em: 24 ago. 2024.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk utilized in small-scale artisan cheese production. **Journal of Food Protection**. Vermont, v. 74, n. 8, p. 1353-1358, ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21819666/>. Acesso em: 16 set. 2024.

FADER, R. C. **Burton: Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527737302/>. Acesso em: 21 out. 2024.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Dairy market review: Overview of global market developments 2023**. Roma, 2024. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/items/17708737-78e8-44f3-9ab7-74e176b40f83>. Acesso em: 19 ago. 2024.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma, 2013. Disponível em: <https://www.fao.org/4/i3396e/i3396e.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2024.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**. Dublin, v. 41, n. 3, p. 340-449. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28419231/>. Acesso em: 14 out. 2024.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. 2 ed. Nova Iorque: Springer, 2017. Livro eletrônico. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Atef-Abou-El-Nour/publication/286119901_CHEESES_Processed_Cheese/links/60e2e4eca6fdccb74506d072/CHEESES-Processed-Cheese.pdf. Acesso em: 13 set. 2024.

GAJEWSKA, J.; WIERZCHOWSKA-CHAJECKA, W.; ZADERNOWSKA, A. Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. **Molecules**, Olsztyn, v. 27, n. 6569, p. 1-17. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/19/6569>. Acesso em: 22 out. 2024.

KATEETE, D. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. Kampala, v. 9, n. 23, aug. 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1476-0711-9-23#citeas>. Acesso em: 21 out. 2024.

KAYILI, E.; SANLIBABA, P. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Turkey. **Internacional Journal of Food Properties**, Ankara, v.23, n. 1, p. 1441-1451. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10942912.2020.1814323>. Acesso em: 22 out. 2024.

KINDSTEDT, P.S. **The history of cheese**. Vermont: Wiley, 2018. Livro eletrônico. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119046165.ch0a>. Acesso em: 23 ago. 2024.

LIU, H. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy herds in northern China. **J Dairy Sci**. Beijing, v. 100, n.11, p. 8796-8803, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865851/>. Acesso em: 22 out. 2024.

MATOS, J. C. et al. Condições higiênico-sanitárias de feiras livres: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, Brasília, v. 06, n. 03, p. 2884-2893, out. 2015. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/rgs/article/view/3118/2803>. Acesso em: 16 set. 2024.

MCVEY, S.; KENNEDY, M; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**, 3 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527728263/>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MOGHASSEM, H. R. et al. Association between the enterotoxin production and presence of Coa, Nuc genes among *Staphylococcus aureus* isolated from various sources, in Shiraz. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v. 16, n. 4, p. 381-384, set. 2015. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4782680/>. Acesso em: 14 out. 2024.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia veterinária: um guia bacteriológico prático**. 2 ed. Canoas: Editora da ULBRA. 2000.

PRABAKUSUMA, A. S. et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheese in Yunnan, China. **Biotech**, v. 12, n. 1. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-021-03072-4#citeas>. Acesso em: 22 out. 2024.

PROCOP, G. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas**. 7 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018. Livro eletrônica. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527734516/>. Acesso em: 16 set. 2024.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária: essencial**. 2 ed. Porto Alegre: Grupo A, 2018. Livro eletrônico. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715000/>. Acesso em: 16 set. 2024.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ed. São Paulo: Editora Blucher, 2017. Livro eletrônico. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521212263/>. Acesso em: 23 set. 2024.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527738941/>. Acesso em: 23 out. 2024.

United States Department of Agriculture (USDA). **PSD Online**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 24 ago. 2024.

VIGNE, J. D. The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. **Elsevier Masson SAS**, Paris, v. 334, n. 3, p. 171-181. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069110002982#section-cited-by>. Acesso em: 19 ago. 2024.

RITTER, J. M. **Rang & Dale Farmacologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2020. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595157255/>. Acesso em: 22 out. 2024.

WHALEN, K.; FINKELL, R.; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia ilustrada**. 6 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582713235/>. Acesso em: 23 out. 2024.

WOONGBOOT, W. et al. Multiplex PCR for detection of superantigenic toxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients and carriers of a hospital in northeast Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Khon Kaen, v. 44, n. 4, p. 660-671, jul. 2013. Disponível em: <https://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2013-44-4-full/16-5748-17.pdf>. Acesso em: 21 out. 2024.

Apêndice A - Lista de verificação das condições higiênico-sanitárias da comercialização de queijo de coalho, baseada na RDC nº 275/2002 e na RDC nº 216/2004, da ANVISA

LISTA DE VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DA COMERCIALIZAÇÃO INFORMAL DE QUEIJO COALHO				Nº:
				Data: ___ / ___ / ___
INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	SIM	NÃO	NA*	Observações
As instalações físicas do estabelecimento possuem revestimento liso, impermeável e lavável?				
Existem lavatórios supridos de produtos destinados à higiene pessoais e de coletores de resíduos dotados de tampa e acionamento sem contato manual?				
As superfícies dos equipamentos, móveis e utensílios utilizados na exposição à venda dos alimentos são lisas, impermeáveis, laváveis e estão isentas de rugosidades, frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higienização dos mesmos e serem fontes de contaminação dos alimentos?				
As instalações, os equipamentos, os móveis e os utensílios estão em condições higiênico-sanitárias apropriadas?				
A edificação, as instalações, os equipamentos, os móveis e os utensílios estão livres de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença, como fezes, ninhos e outros?				
MANIPULADORES	SIM	NÃO	NA	Observações
Os manipuladores apresentam-se com uniformes limpos e em adequados estados de conservação?				

Os manipuladores têm asseio pessoal, apresentando-se com cabelos presos, protegidos por redes, toucas ou outro acessório apropriado para esse fim; sem barba; com unhas curtas e sem esmalte ou base; e sem adornos pessoais e maquiagem?				
Os manipuladores não espirram sobre os alimentos, não cospem, não tosem, não fumam, não manipulam dinheiro ou não praticam outros atos que possam contaminar o alimento?				
Os manipuladores utilizam Equipamentos de Proteção Individual (EPI)?				
O estabelecimento possui cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta lavagem das mãos e demais hábitos de higiene, afixados em locais apropriados?				
Os manipuladores lavam as mãos cuidadosamente antes e após manipular os alimentos?				
ARMAZENAMENTO DO ALIMENTO	SIM	NÃO	NA	Observações
Os alimentos são mantidos em condições de temperatura que não comprometam sua qualidade higiênico sanitária?				
Os alimentos são armazenados em local limpo e organizado, de forma a garantir proteção contra contaminantes?				
Os alimentos são mantidos em local protegido da presença de vetores e pragas urbanas?				

*NA = não se aplica