

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA
OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO
MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU
REFRIGERADO

Laryssa Freitas Ribeiro

Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA
OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO
MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU
REFRIGERADO**

Laryssa Freitas Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Coorientadores: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Dr. Renato Pariz Maluta

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

2016

Ribeiro, Laryssa Freitas
R484c Contaminação por bactérias patogênicas na obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas Frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado / Laryssa Freitas Ribeiro. -- Jaboticabal, 2016
vii, 135 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Luiz Augusto do Amaral

Banca examinadora: Ana Maria Centola Vidal, Manoel Victor Franco Lemos, Hinig Isa Godoy Vicente, José Moacir Marin
Bibliografia

1. *E. coli*. 2. *Listeria spp.* 3. *Staphylococcus aureus*. 4. MRS. 5. Saúde pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.3:637.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGENICAS NA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESVAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO

AUTORA: LARYSSA FREITAS RIBEIRO

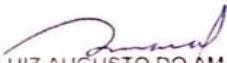
ORIENTADOR: LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

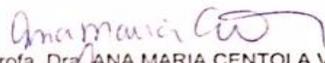
COORIENTADOR: RENATO PARIZ MALUTA

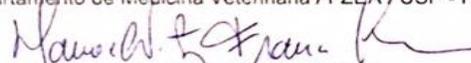
COORIENTADORA: MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS

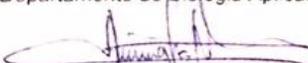
COORIENTADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

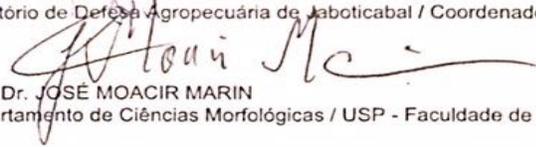
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. HINIGISA GODOY VICENTE
Escritório de Defesa Agropecuária de Jaboticabal / Coordenadoria de Defesa Agropecuária


Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Departamento de Ciências Morfológicas / USP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LARYSSA FREITAS RIBEIRO - Nascida na cidade de Uberaba, Minas Gerais, em 09 de outubro de 1984, filha de João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas. É médica veterinária, formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal. Realizou estágio na mesma universidade, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, no Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, as quais teve duas iniciações científicas com bolsa da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante seu estágio curricular foi para o Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá, sob a supervisão do prof. Dr. John Morris Fairbrother, onde acompanhou e executou atividades, melhorando seu conhecimento teórico e prático. Em agosto de 2011 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da UNESP, câmpus Jaboticabal, também sob a supervisão do Prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, e também com bolsa FAPESP, estagiando mais uma vez no Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Voltou ao Brasil, e finalizou o mestrado em 18 meses. Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado no programa de Medicina Veterinária da UNESP, câmpus Jaboticabal, também sob a supervisão do Prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, com bolsa Capes e auxílio Fapesp. Fez doutorado sanduiche no Canadá, à convite de retorno do prof. Dr. John Morris Fairbrother, o qual permaneceu por 10 meses. Retornou ao Brasil em setembro de 2015 dando continuidade à esse programa.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

Dedico àqueles que mesmo longe estão mais perto que nunca,
Que sonham comigo, e me fazem acreditar, mesmo quando parece impossível,
Porque são em vocês que me inspiro para ser uma pessoa e uma profissional melhor,
Aos meus pais, João Ulisses e Elza,
Com muito amor e muita dedicação,

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus que me deu o dom da vida, muita saúde, oportunidade de me tornar médica veterinária e trabalhar com qualidade de leite e derivados, para o bem da saúde pública. Sou muito feliz e só tenho a agradecer à Ele.

Agradeço aos meus pais, João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas pelo amor incondicional em toda minha vida, mas principalmente nesses 10 anos que vivi fora de casa. Não é fácil morar longe de quem se ama. Mas saibam que sem o apoio de vocês eu jamais teria conseguido. Sei que vocês não mediram esforços pra chegarmos até aqui. Vocês são minha força para eu buscar tudo que eu sonho, tudo que eu desejo. E hoje digo com todas as letras, a vitória não é só minha, mas NOSSA. Muito obrigada meus amados pais!

Agradeço também ao meu querido irmão, Ulisses Freitas Ribeiro, minha paixão, meu orgulho, pessoa ao qual eu admiro muito, principalmente pela força de vontade que tem. Eu desde criança quis seguir seus passos e acho que isso é a maior prova da minha admiração. Te amo muito! Obrigada por estar sempre ao meu lado! Agradeço também à minha cunhada, Tatiane Melo, pelo carinho comigo e por entrar na nossa vida e trazer tanta alegria.

Agradeço às minhas segundas mães, dinha Luzia e Vânia Célia, por todo amor e carinho... Vocês estão ao lado dos meus maiores tesouros, minha mãe e meu pai... Amo vocês!

Ao meu avô Chiquinho, que me proporcionou a paixão pelo gado leiteiro, o gado que era manso, que deixava a gente passar a mão... Ele que quando eu era pequena separava a vaquinha para podermos tomar leite "saudável". Lembro de quando tinha apenas sete anos, calcei sua bota na fazenda e saí falando "Hoje eu vou tirar o leite". Meu vizinho é a prova de que "o trabalho enobrece e dignifica o homem". Eu o admiro muito pelo império que construiu em toda sua vida com seu suor, atrás de um carro de boi. Eu quero poder ter metade da força que o senhor teve para atingir meus sonhos...

Às minhas primas, Luana Zago e Luciana Zago, que são como irmãs para mim, minhas confidentes, amigas, que tanto amo! Vocês faziam com que cada ida a Uberaba fossem mais intensas e enchiam meu coração de alegria!

À toda minha família, por todo o amor e carinho sempre! Vocês são a minha base!

Ao meu namorado Henrique Suriani que apareceu de repente na minha vida e me mostra, a cada dia que passa, que as coisas mais simples podem ser as mais especiais e as mais inesquecíveis...

Às amigas Mury (Priscila Arrigucci), Tetxu (Maite del Collado), Selvi's (Letícia Lavezzo), Barraka (Luciana Diniz), Franga (Carolina Nogueira), amizades verdadeiras que levo da Faculdade para sempre comigo... Amo muito!

Às meninas da república "As Coyotes", que foi minha eterna casa, com quem vivi os melhores momentos. Amo vocês meninas!!

Às minhas eternas doutorandas Bel Medeiros, Fernanda Pinto e Mayhara Martins (Gege), com quem aprendi muito do que sei de laboratório, com quem aprendi a ter amor no que faço. Obrigada pelos ensinamentos passados, pela paciência e carinho até hoje comigo! Amo vocês!

Ao pessoal do "Simpósio de qualidade de leite", Chiks (Ana Paula), Guampa (Carol), Kadu (Carlos), Purga (Cecília), Bolinha (Gabriel) Tainá (Henrique), Rabino (Ivan), porque aprendemos muito uns com os outros e juntos somos mais que uma equipe, mas grandes amigos que levo para uma vida. Amo vocês!!

À minha família Canadense Natália Rodrigues, Patrice Simard e às crianças Nicole e Eric, que me acolhem sempre com tanto amor. Me fazem sentir no Brasil quando estou no Canadá e me fazem morrer de saudades quando estou no Brasil. Eu amo vocês!!! Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, mesmo a -35°C, em guerra de neve. Vocês foram o melhor presente que o Canadá me deu.

Às meninas do lab, minhas amigas Roberta e Andressa, obrigada por todos os dias de convivência! Pelas brincadeiras, por fazerem com que os dias corridos e tensos fossem mais leves e mais sorridentes. Eu não sei o que seria de mim se não fossem vocês nesses últimos meses... Um muito obrigada em especial à Andressa, minha

também co-orientadora, meu braço direito e esquerdo, que me ensinou tantas coisas nesses últimos tempos. A gente foi se conhecer realmente em 2015, quando cheguei do Canadá e além de co-orientadora, ganhei uma amiga e confidente! Muito obrigada por tudo que fez por mim! Pelos dias até tarde no lab, pelas dúvidas tiradas, pela amizade e por tudo que ainda sei que fará por mim!

Meu amigo Japa, Rafael Akira Sato, meu companheiro de coleta, de lab e de estresse.. Quantas coisas passamos juntos.. Nem sei como te agradecer por tanta coisa. Obrigada por ser meu companheiro desde preparo de meio de cultura, às coletas, laboratório, autoclaves “suja” e por fazer com que todos os produtores de leite amassem a gente!

À Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Júnior (Diba), pela amizade, conselhos e companheirismo. Saibam que tenho um carinho enorme por vocês!

Aos meu co-orientadores Andressa de Souza Pollo, Maria Izabel Merino de Medeiros e Renato Pariz Maluta, aos ensinamento dados!

To Dr. John Morris Fairbrother, my canadian professor and my friend for the incredible opportunity to stay at University of Montreal (UdeM), one of the top universities worldwide. Thank you for believing me and become myself a better researcher.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, pelos 9 anos de orientação. Lembro como se fosse hoje quando o procurei para uma iniciação, no meu segundo ano de faculdade, e fui recebida de braços abertos pelo senhor, que nem me conhecia direito. A confiança foi crescendo e aqui estamos. São 9 anos de orientação de professor para aluna e também de pai para filha. Quantas vezes entrei na sua sala pedindo conselhos e no mesmo número de vezes, o senhor pacientemente conversou comigo. Obrigada por todos esses anos. Hoje tenho certeza que sou não só uma profissional e pesquisadora melhor mas também uma pessoa melhor graças ao senhor, esse ser iluminado. Esse título não é só meu, mas NOSSO. Muito obrigada por tudo o que o senhor fez por mim. Por apoiar e acreditar nos meus sonhos loucos, como o de querer ir para o exterior e de querer comprar nanodrop para nosso lab. Esses sonhos só existiram porque o senhor acreditava em mim. Eu espero, um dia, fazer

metade à saúde pública e aos produtores rurais de leite, que o senhor já fez. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e me desculpe pelas minhas falhas.

À professora Dra. Ana Maria Centola Vidal, professora a qual eu admiro muito pelos ensinamentos que me passa sobre a qualidade de leite e derivados e também pelo pessoa que é. Obrigada pela amizade!

À banca examinadora prof Dra. Ana Maria Centola Vidal, prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, Dra. Hinig Isa Godoy Vicente, prof. Dr. José Moacir Marin pela disponibilidade de participar e pelas contribuições dadas à esta tese e aos artigos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal que participaram desta minha trajetória, os quais guardo um enorme carinho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade do curso de pós-graduação.

À Capes pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Leite e a produção de queijo Minas frescal.....	3
2.2. Bactérias Gram-negativas veiculadas por leite e derivados.....	6
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	6
2.3. Bactérias Gram-positivos veiculadas por leite e derivados.....	10
2.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.3.2. <i>Staphylococcus</i> spp.	12
2.3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.2.2. <i>Staphylococcus</i> resistentes à meticilina (MRS).....	15
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> DETECTADOS EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO.....	30
RESUMO.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1. Coleta das amostras.....	32
2.2. Preparo das amostras para isolamento de <i>E. coli</i>	38
2.3. Obtenção das coleções de <i>Escherichia coli</i>	39

2.3.1. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> comensais.....	41
2.3.2. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> potencialmente patogênicos.....	41
2.3.3. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> resistentes à Ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL).....	45
2.4. Agrupamento filogenético.....	46
2.5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência	48
2.6. Análise epidemiológica dos isolados de <i>E. coli</i> por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	50
2.7. Análise molecular para identificação de genes de resistência por PCR.....	51
2.8. Sorologia para detecção do antígeno somático (O).....	54
2.9. Multilocus Sequence Typing (MLST)	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1. Isolamento de <i>E. coli</i> nos diferentes pontos da obtenção do leite e produção do queijo tipo Minas frescal e análises genotípicas.....	57
3.1.1. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> comensais.....	57
3.1.2. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> potencialmente patogênicos.....	58
3.1.3. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> resistentes à ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL).....	63
3.2. Agrupamento filogenético.....	64
3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência	68
3.4. Análise epidemiológica dos isolados de <i>E. coli</i> por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	71
3.5. Identificação de genes de resistência por PCR.....	77
3.6. Sorologia para detecção do antígeno somático (O).....	81
3.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)	83
4. CONCLUSÕES.....	86
5. REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO 3 – GRAM-POSITIVOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO.....	95
RESUMO.....	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
2.1. Coleta das amostras.....	97
2.2. Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e identificação de espécies e genes de virulência.....	97
2.3. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e detecção dos genes de enteroxinas.....	100
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1. Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e identificação de espécies e genes de virulência.....	104
3.2. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e detecção dos genes de enteroxinas.....	107
4. CONCLUSÕES.....	110
5. REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 4 – PREVALÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus</i> spp. RESISTENTES À METICILINA DETECTADOS EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO...	115
RESUMO.....	115
1. INTRODUÇÃO.....	116
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
2.1. Coleta das amostras.....	117

2.2. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina (MRS) na obtenção do leite e na produção de queijos tipo Minas Frescal.....	117
2.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS.....	119
2.4. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD.....	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
3.1. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina (MRS) nos diferentes pontos da obtenção do leite e da produção do queijo tipo Minas frescal.....	124
3.2. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS.....	125
3.3. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD.....	127
4. CONCLUSÕES.....	130
5. REFERÊNCIAS.....	130
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01994/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Contaminação por bactérias patogênicas na obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO - A produção de queijos elaborados a partir de leite cru refrigerado no Brasil ainda é alta, embora esta prática não seja autorizada em algumas regiões do país, como no estado de São Paulo. Assim, a fim de dimensionar os riscos de veiculação bacteriana em tal tipo de alimento e identificar suas fontes de contaminação, este estudo objetivou detectar a presença de bactérias patogênicas em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal. Amostras de suabes de fezes bovinas, mãos de ordenhador, balde de ordenha, leite, soro, água, superfície de elaboração de queijos, mãos de manipulador do queijo, peneiras, bandejas, fôrmas e escumadeiras foram coletadas em cinco propriedades onde os queijos são elaborados a partir de leite cru na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo. Foram pesquisadas *E. coli* potencialmente patogênicas e bactérias do gênero *Listeria spp.* e *Staphylococcus*, incluindo aqueles resistentes à meticilina (MRS). Os isolados de *E. coli* foram separados em três coleções, de patogênicas, comensais e resistentes à ceftriaxona (ESBL). Encontrou-se importantes isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos, como STEC e ExPEC, inclusive em amostras de leite e queijo. Os isolados de *E. coli* foram pertencentes, em sua maioria, aos grupos filogenéticos A e B1. O sorogrupo mais encontrado foi o O18 e, segundo o MLST, obteve-se isolados ST131, características relacionadas a estirpes potencialmente patogênicas. Tais isolados apresentaram resistência antimicrobiana principalmente ao ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina. A análise de similaridade genética por PFGE indicou que isolados de *E. coli* da mesma propriedade, contendo o mesmo gene de virulência, circularam em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos tipo Minas frescal. O gênero *Listeria spp.* teve uma alta prevalência nas amostras, no entanto, não foram identificadas as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*. *S. aureus* foi encontrado em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos, principalmente em amostras de queijo, em todas propriedades. Tais isolados eram, inclusive, portadores de diferentes genes codificadores de enterotoxinas. Isolados MRS foram obtidos em queijos e mãos de manipuladores de queijos e mostraram-se resistentes à oxacilina, penicilina e cefepime. Tais isolados foram identificados como *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. epidermidis* pelo sequenciamento gênico e, segundo o RAPD, houve similaridade genética entre isolados das mãos dos manipuladores e queijos. Assim, conclui-se que a elaboração de queijos a partir de leite cru está associada a más condições higiênicas e que microrganismos com potencial risco à saúde pública podem chegar no produto final, o queijo.

Palavras-chaves: *E. coli*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, MRS, saúde pública

CONTAMINATION BY PATHOGENIC BACTERIA IN MILK OBTENTION AND PRODUCTION OF MINAS FRESCAL CHEESE PREPARED FROM REFRIGERATED RAW MILK

ABSTRACT – Cheese production made from refrigerated raw milk in Brazil is still high although this practice is not allowed in some regions of the country as in São Paulo state. Thus, in order to assess bacterial infection risks in this type of food and to identify sources of contamination this study aimed to detect the presence of pathogenic bacteria in different points of milk production and the production of Minas Frescal cheeses. Samples of faeces swabs, milker hands, milking pails, milk, water, cheese elaboration surface, cheese manipulator hands, sieves, trays, molds and skimmers were collected in five properties where the cheeses are made from raw milk in the region of Jaboticabal, northeast of São Paulo State. We investigated potentially pathogenic *E. coli*, *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp., including those resistant to methicillin (MRS). *E. coli* isolates were separated into three collections, pathogenic, commensal and resistant to ceftriaxone (ESBL). Significant pathogenic *E. coli* isolates such as STEC and ExPEC were found in milk and cheese samples. *E. coli* isolates belonged mostly to phylogenetic groups A and B1. The most commonly serogroup found was O18 and according to the MLST, isolates ST131 were obtained and they are related to potentially pathogenic strains. These isolates presented antimicrobial resistance mainly to nalidixic acid, ampiciline, kanamycin, streptomycin, sulfisoxazole and tetracycline. The genetic similarity analysis by PFGE indicated that *E. coli* isolates from the same property containing the same virulence gene were circulating at different points of milk production and in the production of Minas Frescal cheeses. The genus *Listeria* spp. had a high prevalence in the samples, however, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. ivanovii* species were not identified. *S. aureus* was found at different points of milk production and cheeses production, mainly in cheese samples in all properties. Such isolates were also carrying different enterotoxin-encoding genes. MRS isolates were obtained in cheeses and cheese manipulator hands and were resistant to oxacillin, penicillin and cefepime. These isolates were identified as *S. haemolyticus*, *S. hominis* and *S. epidermidis* by gene sequencing and according to RAPD there was genetic similarity between isolates from the hands of the manipulators and cheeses. Thus, it can be concluded that the preparation of cheeses from raw milk is carried out under poor hygienic conditions and that microorganisms with a potential public health risk can reach the final product, cheese.

Keywords: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, MRS, public health

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O setor de produção de leite exerce enorme importância econômica e social por ser um gerador de empregos. Mesmo as pequenas propriedades rurais, muitas vezes familiares, possuem grande relevância social tanto pelo número de famílias envolvidas quanto pelo volume de leite produzido. Muitos agricultores sobrevivem integralmente da renda gerada pela atividade leiteira (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006) e, para complementar esta renda, investem na produção clandestina de queijos, elaborados a partir de leite cru. A produção destes queijos geralmente é tradicional, passado de geração em geração em muitas regiões brasileiras. E esta diferencia-se da produção industrial pela não utilização de processos mecanizados e pela ausência de pasteurização do leite (EMBRAPA, 2011).

O queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru possui alto valor nutritivo, proteínas, matéria graxa, cálcio e fósforo (ALAIS, 2003). No entanto, por ser um alimento cru, em determinadas condições, este queijo pode veicular uma série de bactérias patogênicas, tais como aquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A presença de tais bactérias pode indicar contaminação fecal e falta de higiene na elaboração do queijo (HOFFMANN et al., 2004).

Em geral, a presença de microrganismos patogênicos em alimentos deve ser avaliada a fim de se conhecer as condições higiênico-sanitárias da sua produção e, conseqüentemente, da sua qualidade (CARDOSO; ARAÚJO, 2004). Além da contaminação microbiológica, a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode selecionar microrganismos resistentes que também podem ser utilizados no tratamento de enfermidades infecciosas em seres humanos (MANTILLA et al., 2008; RAPINI et al., 2004). Já foi comprovado que alimentos de origem animal servem como veículo de patógenos resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções em humanos (BARBOSA; JORGE; UENO; 2007).

O queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru faz parte da cultura brasileira, não somente do estado de Minas Gerais, como também de outras regiões

do País. Neste contexto, a região de Jaboticabal, no estado de São Paulo, possui várias propriedades que produzem esse tipo de queijo que é comercializado nas próprias propriedades, em supermercados, varejões ou por vendedores ambulantes, tratando-se, assim, de uma economia significativa.

Dada a importância social, cultural e econômica dos queijos elaborados a partir de leite cru e do alto risco de veiculação de microrganismos que tal alimento possui, muitos resultados de pesquisas foram publicados nos últimos anos (GAULIN et al., 2012; VAN CAUTEREN et al., 2009; DOMINGUEZ et al., 2009). Entretanto, grande parte dos estudos visam a identificação de microrganismos por técnicas de microbiologia clássica e testes bioquímicos, os quais podem falhar na identificação acurada de espécies microbianas. Dessa forma, estudos moleculares fazem-se imprescindíveis para a correta identificação de espécies bacterianas e suas relações genéticas. Assim, a fim de dimensionar os riscos de veiculação bacteriana em tal tipo de alimento e identificar suas fontes de contaminação, este estudo objetivou detectar a presença de bactérias patogênicas em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal em cinco propriedades na região de Jaboticabal, São Paulo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite e a produção de queijo Minas frescal

O leite é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente devido à sua composição proteica, de vitaminas e sais minerais, podendo ser consumido na forma original ou como derivados. Devido à sua composição, este importante alimento constitui um excelente meio de cultura para microrganismos (CHYE et al., 2004). Dessa forma, a obtenção do leite deve ser realizada com máxima higiene e o armazenamento deve ser em baixa temperatura, ao longo de toda a cadeia produtiva, visando garantir suas características físicas, químicas, nutricionais (BONFOH et al., 2003) e, conseqüentemente, a qualidade de seus derivados.

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos registrados na história da humanidade. Acredita-se que tenha sido originado na região entre os rios Tigre e Eufrates, no Iraque, há aproximadamente 8.000 anos, época na qual os animais começaram a ser domesticados (FOX, 1993). Os queijos contribuíram significativamente para o desenvolvimento das civilizações. Historicamente, este alimento permitiu a sobrevivência de populações em períodos de fome e forneceu nutrientes vitais à boa saúde, tornando-se, então, desejável na dieta humana diária (KOSIKOWSKY, 1970).

Na antiguidade clássica, povos da Grécia e do Império Romano testemunharam a produção de queijos. Esta era feita, em Roma, pela adição do *coagulum*, extraído do quarto estômago de cordeiro ou cabrito, ao leite. O leite coagulado era, então, espremido para a retirada do soro, salpicado e deixado endurecer ao sol. Atribui-se, então, aos romanos a consolidação da produção de queijos, segundo normas de qualidade e técnicas de produção, o que garantiu ao produto prestígio de alimento nobre (KOSIKOWSKY, 1970).

Posteriormente, durante a Idade Média, a Igreja Católica começou a participar mais ativamente da economia da Europa Ocidental, principalmente com a produção de queijos realizada em mosteiros. Os monges introduziram inovações na fabricação do produto, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de muitos tipos de queijo comercializados atualmente (KOSIKOWSKY, 1970).

Já no Brasil, a produção de queijos foi introduzida pelos imigrantes portugueses, no período colonial, com o queijo tipo “Serra da Estrela”, e posteriormente sofreu adaptações devido às condições ambientais de cada região, criando-se o queijo fresco (BORELLI et al., 2006; LIMA et al., 2009). Este é um dos principais derivados do leite no país, e é, em sua maioria, produzido de forma artesanal por pequenos produtores (SALOTTI et al., 2006). No processo de fabricação do queijo, enzimas de coagulação desestabilizam micelas de caseína do leite, e essas são retidas nas proteínas da coalhada, a qual é usada para a fabricação do queijo. Além disso, proteínas menores, hidrossolúveis, são expelidas para a fase aquosa, o soro de leite (CHROMIK et al., 2010).

Desde 2002, o queijo artesanal tem uma legislação específica que regulamenta a sua produção no Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2002) e posteriormente, em 2008, sua produção foi reconhecida como patrimônio imaterial Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). No Estado de São Paulo, a lei 10.507, de 2000 (BRASIL, 2000), estabelece normas para a elaboração do queijo tipo Minas frescal e sua comercialização e a Instrução Normativa 16/2015 do MAPA (BRASIL, 2015), estabelece as normas específicas de inspeção e a fiscalização sanitária de produtos de origem animal em todo o território nacional, referente às agroindústrias de pequeno porte.

Devido ao fato de os queijos terem grande significado social, econômico e cultural, e serem tradicionalmente feitos a partir de leite cru, as questões relacionadas com a sua segurança, qualidade e proveniência são preocupantes e visam a proteção dos produtores e consumidores.

Os alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de serem contaminados pelo uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados (DUARTE et al., 2005; LEITE et al., 2005). Além disso, a falta de informação e de treinamento das pessoas que fabricam e manuseiam tais alimentos pode acarretar em contaminação por diversos microrganismos, comprometendo a qualidade e a segurança da saúde do consumidor. Por esse motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação do produto. Ademais, o queijo não maturado é um produto perecível e deve ser consumido rapidamente, após curta

estocagem e em ambiente refrigerado (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; FEITOSA et al., 2003; SALOTTI et al., 2006; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006), caso contrário pode não ser seguro para o consumidor.

Assim, tratando-se de segurança e qualidade de queijos, é importante que o controle de qualidade comece desde a obtenção do leite e envolva todas as etapas de produção, até o produto final. Falha em qualquer fase do processo poderá resultar em contaminação do alimento, que, mesmo apresentando aparência, gosto, consistência e aroma normais, pode veicular diversos microrganismos patogênicos. Dependendo do microrganismo, os primeiros sintomas são evidenciados nas primeiras 36h após o consumo do alimento contaminado (OKURA, 2005). Em países industrializados, o leite e os produtos lácteos estão envolvidos em 2 a 6% de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) relacionados à ingestão de alimentos (CLAEYS et al., 2013).

São importantes causas de DTAs e transmissão de zoonoses os contaminantes de origem exógena, incluídos os microrganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Portanto, a grande preocupação é impedir que esses microrganismos estejam associados à matéria-prima e se multipliquem no alimento (GERMANO; GERMANO, 2008).

Em Minas Gerais, por exemplo, estado com alta produção de queijos elaborados a partir de leite cru no país, Menezes et al. (2009) pesquisaram a qualidade microbiológica deste alimento. Das amostras analisadas, 57% estavam acima dos limites microbiológicos exigidos pela legislação em um ou mais parâmetros. Populações inaceitáveis de *Staphylococcus* coagulase-positivos e coagulase-negativos foram registradas em 42,5% e 51,7% das amostras, respectivamente. Segundo os autores, essa condição é indesejável, uma vez que o queijo Minas tipo Minas frescal não passa por tratamento que vise eliminar esses microrganismos nocivos à saúde pública.

Dessa forma, o queijo tipo Minas frescal constitui-se em risco para a saúde pública e necessita ter sua qualidade microbiológica atestada, principalmente no que diz respeito à pesquisa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas prejudiciais à saúde humana (FERNANDES et al., 2006).

2.2. Bactérias Gram-negativas veiculadas por leite e derivados

2.2.1. *Escherichia coli*

No Brasil, tem-se evidenciado a presença de microrganismos patogênicos em queijos produzidos a partir de leite cru, sendo amplamente reconhecida a presença de coliformes termotolerantes no produto em vários estudos realizados em diferentes locais, como em Poços de Caldas, MG, por Almeida Filho e Nader Filho (2002), em cidades do interior do Paraná, por Kottwitz e Guimarães (2003), na cidade do Rio de Janeiro, por Barros et al. (2004), em Três Passos, MG, por Almeida e Franco (2003), e no Estado de Goiás, por Campos et al. (2006). Esses estudos mostraram a presença de coliformes nos alimentos, porém nenhum deles aprofundou suas pesquisas em busca de isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos e no estudo epidemiológico desses microrganismos.

A presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e a presença de outras bactérias enteropatogênicas. Entretanto, alguns grupos de *E. coli* são patogênicos e podem ser transmitidos por alimentos. Assim, mesmo em quantidades reduzidas, podem tornar-se significativas, em especial quando as condições do meio no qual se encontram permitem sua multiplicação (FRANCO; LANDGRAF, 2002), como acontece com o leite e seus derivados.

No mundo, alguns surtos de *E. coli* diarreiogênicas foram descritos pelo consumo de leite ou derivados cru. Liptakova et al. (2004) relataram um surto de colite hemorrágica ou síndrome hemolítica urêmica causada por *E. coli* O157, que se encontrava em leite não pasteurizado consumido por uma família na Eslováquia. Galia et al. (2015) descreveram um surto por *E. coli* O26:H11 proveniente de queijos elaborados a partir de leite cru na França, e Ombarak et al. (2016) relataram uma alta prevalência de amostras de *E. coli* patogênicas em leite e queijo cru em alguns países como no Egito. Além disso, foram descritos estudos em países como Canadá (HONISH et al., 2005), Estados Unidos (WILLIAM, 2011) e Escócia (STRACHAN et al., 2006), também com leite e derivados. Um estudo prévio feito com 50 queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado no Meio Oeste do Brasil detectou 96%

das amostras contaminadas com *E. coli* (PANETO et al., 2007).

E. coli associadas à infecção intestinal e causadoras de diarreia em humanos são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e são classificadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC), shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004).

Os diferentes grupos de *E. coli* diarreio gênicas podem estar presentes em derivados de leite, como reportado no México por Canizalez-Roman et al. (2013). De um total de 669 produtos de laticínios analisados, detectou-se 2,84% de *E. coli* diarreio gênicas e, entre essas, 68,42% EPEC, 10,52% EAEC, 15,78% STEC e 5,26% ETEC.

Sabe-se que a dose infectante de STEC é de 10 UFC em pessoas susceptíveis (SCHMID-HEMPEL; FRANK, 2007), então, para um queijo ser seguro à saúde humana, nenhuma STEC deve estar presente. Por isso há tamanha importância no controle de STEC, não somente na produção de leite como também em todas as etapas de fabricação do queijo.

Outros dois grupos em destaques são EPEC e EAEC, que em São Paulo, são as categorias de *E. coli* mais comumente associadas a diarreia infantil (ARAÚJO et al., 2007). Apesar disso, ainda existem poucos estudos com o subgrupo aEPEC (BORGES et al., 2012; STELLA et al., 2012), sendo assim fazem-se necessárias mais pesquisas com o objetivo de detectar estes patótipos em alimentos.

Além disso, existem as *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC), cuja denominação mais frequentemente empregada se refere ao seu sítio de isolamento e não às características que definem um patótipo, particularmente com relação ao conjunto de fatores de virulência que possuem. Dessa forma, as amostras isoladas de infecções urinárias são conhecidas como UPEC (*E. coli* Uropatogênica) e aquelas isoladas de pacientes com meningite como MNEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) (SANTOS et al., 2009). As infecções extraintestinais podem acometer o trato urinário, o sistema nervoso central, o sistema circulatório e o sistema respiratório (RUSSO; JOHNSON, 2000). Sabe-se que isolados de um determinado sítio podem causar infecções em outros sítios do hospedeiro e até

mesmo em hospedeiros diversos. Devido a tais incongruências, os autores Russo e Johnson (2000) propuseram a denominação de ExPEC, visando englobar todas as amostras de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais, independentemente do hospedeiro e do sítio de isolamento.

A infecção por ExPEC não ocorre de forma epidêmica, mas sim de forma discreta, causando somente um leve comprometimento do hospedeiro. Devido à isso, não há tantas notificações deste grupo (JOHNSON; RUSSO, 2002). Entretanto, cepas de ExPEC já foram isoladas de produtos alimentícios, principalmente de alimentos de origem animal, indicando que tais bactérias constituem uma classe de patógenos alimentares em potencial (SMITH et al., 2007).

Análises de grupos filogenéticas de *E. coli* mostraram que os isolados pertenciam a quatro principais grupos: A, B1, B2 e D (SELANDER et al., 1987; HERZER et al., 1990). As amostras extraintestinais com fatores de virulência pertencem principalmente ao grupo B2 e em menor quantidade ao grupo D (BINGEN et al., 1998; BOYD; HARTL, 1998; PICARD et al., 1999; JOHNSON; STELL, 2000), enquanto a grande maioria das comensais pertencem ao grupo A. *Escherichia coli* pertencentes ao grupo D, e em sua maioria ao grupo B2, tem sido relacionadas com doenças extraintestinais, e as comensais e as causadoras de doença diarreica são membros do grupo A, B1, e D (LECOINTRE et al., 1998; GIRARDEAU et al., 2005; REGUA-MANGIA et al., 2009). Essa análise mostra, ainda, a origem da contaminação fecal, como por exemplo bovinos, humanos, suínos, entre outros (CARLOS et al., 2010).

Ademais, a identificação do sorogrupo ao qual pertencem os isolados de *E. coli* tem importância pois alguns ocasionam doenças em humanos. Por exemplo, Paneto et al. (2007) encontraram os sorogrupos O125, O111, O55 e O119 em 14% de amostras de queijos elaborados com leite cru. Tais sorogrupos foram relatados como envolvidos em doenças humanas (KAPER et al., 2004).

Além do conhecimento do grupo filogenético e do sorogrupo das *E. coli*, é de suma importância, a pesquisa da sua resistência a antimicrobianos. Alimentos de origem animal servem como fonte de patógenos resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções por microrganismos resistentes em humanos (BARBOSA; JORGE; UENO; 2007). No Estado do Paraná,

Brasil, por exemplo, 260 amostras de leite pasteurizado foram coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais e foram encontrados 47 isolados de *E. coli*, com altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos como ampicilina (19,2%), cefalotina (18,9%) e tetraciclina (17,1%) (ZANELLA et al., 2010). Um outro estudo, também no Brasil, mostrou que os grupos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento para infecções em gado leiteiro, representando 38,22% do total de todos os antibióticos, seguidos pelos aminoglicosídeos (25,19%) e pela tetraciclina (15,41%) (NETTO et al., 2005).

Uma pesquisa que abordou o estudo de frangos e suínos, suas respectivas carnes, humanos saudáveis e pacientes com infecções no trato urinário (ITU) mostrou que os isolados de *E. coli* foram resistentes a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina e que a resistência dos isolados provenientes de pacientes com ITU foi similar à daqueles isolados de diferentes tipos de carne e dos animais. Tais resultados indicaram que os alimentos e os animais constituem uma fonte de patógenos resistentes para os pacientes com ITU e para a comunidade em geral (JAKOBSEN et al., 2010).

Além disso, estudos epidemiológicos têm sido utilizados para estabelecer a origem das contaminações dos alimentos, utilizando técnicas de tipagem bacteriológica, pelas quais estabelecem-se relações genéticas entre isolados de diferentes pontos da cadeia produtiva de alimento, animais, manipuladores, equipamentos, entre outros (FOXMAN; RILEY, 2001). Origens clonais comuns entre isolados bacterianos de animais e seres humanos podem identificar animais como fontes de infecção de diferentes patógenos. Para isso, uma técnica que pode ser empregada no estudo de clones é a realização da macrorrestrrição do DNA, seguida pela passagem em gel de agarose por eletroforese em campo pulsado (pulsed field gel electrophoresis - PFGE). Essa técnica é altamente reprodutível, e seu desempenho é igual ou superior ao de outras técnicas disponíveis, sendo aplicada com êxito por um grande número de pesquisadores, principalmente para a tipagem de *E. coli*, sendo esta técnica a mais indicada para este microrganismo (BIDET et al., 2005).

Não obstante, atualmente outros métodos moleculares também têm sido empregados para a tipagem de *E. coli*, dentre eles o "Multilocus Sequence Typing"

(MLST). Esta técnica baseia-se no sequenciamento de alguns genes essenciais ao funcionamento da célula, com baixa taxa de mutação, chamados genes *housekeeping*. Após o sequenciamento dos isolados bacterianos de interesse, as sequências desses genes são alinhadas às demais sequências depositadas em um banco de dados. Para cada gene “*housekeeping*”, sequências diferentes de cada estirpe bacteriana são consideradas alelos distintos e recebem arbitrariamente um número para identificação daquele alelo. O conjunto de alelos de cada amostra bacteriana dá origem ao perfil alélico ou *sequence typing* (ST), que é utilizado para análises filogenéticas de patógenos bacterianos. Tal técnica possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes partes do mundo. (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

2.3. Bactérias Gram-positivos veiculadas por leite e derivados

2.3.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é ubíqua, prevalente em ambientes naturais, e é transmitida na cadeia alimentar de animais e seres humanos, podendo causar morte (JANA et al., 2014). Essa capacidade de ser ubíqua relaciona-se, com a sua capacidade de se multiplicar sob uma ampla faixa de temperatura e sob estresse, tais como pH baixo e alta concentração de sal (INDRAWATTANA; NIBADDHASOBON, 2011). *Listeria monocytogenes* é portadora de genes de virulência, como da fosfolipase (gene *plcA*), de hemolisina (gene *hly*) e gene da invasão à proteína celular (*iap*) (RANTSIOU et al., 2012).

Um trabalho sobre a ecologia de *Listeria* spp. levou os autores a proporem que este microrganismo está amplamente distribuído na natureza e que o solo é um habitat importante para persistência deste gênero bacteriano no mundo (LINKE et al., 2014). Por estar amplamente distribuída no ambiente, *L. monocytogenes* foi descrita sendo veiculada por diferentes alimentos, destacando-se os produtos lácteos, leite cru ou pasteurizado, sorvetes e queijos (GERMANO; GERMANO, 2008), podendo resistir até mesmo à pasteurização do leite (QUINN et al., 2005).

Listeria monocytogenes é um dos principais patógenos envolvidos em surtos

pela ingestão de leite e produtos lácteos (KOUSTA et al., 2010). Segundo Silva et al. (2010) *L. monocytogenes* é um dos microrganismos que é patogênico e psicrotrófico. Além disso, em número elevado são responsáveis pela redução da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, por constituírem grupos deterioradores (BARTOLOMEU et al., 2011). Normalmente, estão amplamente difundidos na natureza e se multiplicam em alimentos conservados sob refrigeração (0-7°C), no prazo de 7 a 10 dias, mas apresentam temperatura ótima em torno de 20°C (SILVA et al., 2010).

A listeriose é uma doença que acomete principalmente idosos, recém-nascidos, gestantes e pessoas imunocomprometidas (FRECE et al., 2010). Os principais sintomas podem variar desde uma gripe à gastroenterite, meningite, encefalite e até mesmo septicemia (este microorganismo, na sua forma invasiva, atravessa a barreira intestinal, podendo alcançar diversos órgãos) e, em mulheres grávidas infectadas no segundo ou terceiro mês de gestação pode causar aborto, nascimento prematuro ou nascimento do bebê já morto (FORSYTHE, 2010).

Em todo o mundo, 261 casos clínicos e 18 mortes foram causadas por surtos de listeriose associada ao consumo de leite cru ou queijo de leite cru de 2000 a 2010 (HALL; FRENCH, 2011).

Destes 2500 casos graves de listeriose relatados nos Estados Unidos anualmente, aproximadamente 500 evoluíram para óbito (a letalidade pode chegar a 40% em pessoas com mais de 50 anos) (GERMANO; GERMANO, 2008). Nos casos de meningites, essa taxa pode atingir 70%, em quadros de septicemia 50% e, em infecções neonatais a letalidade pode ser superior a 80%. Além disso, as gestantes devem ter cuidado com a ingestão de certos alimentos, pois, nesta situação, a listeriose pode causar sintomas brandos, como os de uma gripe, porém o feto pode ser infectado pela via placentária, podendo ocorrer morte fetal e aborto. A taxa de letalidade em lactentes, associada a esse tipo de infecção, é de cerca de 60%. Assim, a listeriose deixou de ser uma doença de pouca importância e passou a ser causa de grande preocupação tanto para as autoridades da saúde quanto para a indústria alimentícia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Além de *L. monocytogenes*, há relatos de algumas infecções humanas ocasionais causadas por *L. innocua* (PERRIN et al., 2003), *L. seeligeri* (ROCOURT et al., 1986) e *L. ivanovii* (GUILLET et

al., 2010).

No Brasil, Delgado da Silva et al. (1998) encontraram genes de *L. monocytogenes* em 7 de 17 (41%) das amostras de queijos Minas frescal elaborados a partir de leite cru e também em 1 de 33 (3%) de queijos Minas frescal elaborados a partir de leite pasteurizado. Outra pesquisa mostrou a presença de *L. monocytogenes* em 10% das amostras de queijo Minas frescal de uma das dez marcas testadas, e nenhuma positividade foi encontrada nas 50 amostras de leite avaliadas (BRITO et al., 2008). Apesar da baixa prevalência, este importante patógeno pode encontrar-se presente nos alimentos de origem animal.

O Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo orienta que a ocorrência de surtos de listeriose requer a notificação imediata às autoridades de vigilância epidemiológica municipal, regional ou central, dentre outras medidas que devem ser aplicadas (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2003). Não há muitos relatos de surtos envolvendo *L. monocytogenes*, o que pode estar relacionado à falta de diagnóstico ou à falta de notificação às autoridades.

Em 2009, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou a Instrução Normativa N° 9, de 9 de abril, que visa a aplicação dos procedimentos de controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (BRASIL, 2009), o que mostra a importância do estudo deste patógeno em queijos produzidos a partir de leite cru.

2.3.2. *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. podem estar associados à intoxicação alimentar pela ingestão de diferentes alimentos (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Leite cru e derivados lácteos, como queijos, são os alimentos mais associados a casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003). Tais quadros de intoxicação alimentar estão associados à ingestão de alimentos que foram extensamente manipulados durante ou após o seu preparo e que, além disso, foram acondicionados em temperaturas inadequadas, favorecendo assim a multiplicação do microrganismo e a produção de enterotoxinas (de SANTANA et al., 2010).

Os principais sintomas da intoxicação estafilocócica são náuseas, vômitos,

cólicas abdominais, diarreia, sudorese, dores de cabeça e, em alguns casos, quadros febris ou de hipotermia. Em uma compilação realizada com pacientes acometidos por intoxicação estafilocócica, observou-se que o sintoma mais recorrente foi vômito (82%), seguido de náusea (74%), diarreia aquosa (68%) e dores abdominais (64%) (SEO; BOHACH, 2007). O período de incubação varia de 30 min a 8h, sendo em média de 2 h após a ingestão do alimento contaminado, com cura espontânea após 24h (DINGES et al., 2000; LE LOIR; BARON; GAUTIER,, 2003). A taxa de letalidade é muito baixa, sendo mais preocupante quando há o acometimento de indivíduos idosos e crianças, devido à possível ocorrência de quadros de desidratação severa (BALABAN; RASOOLY, 2000).

De maneira geral, a intoxicação alimentar estafilocócica é considerada uma doença subnotificada. Devido ao caráter autolimitante da doença, que provoca sintomatologia branda e de curta duração, os casos e surtos desse tipo de intoxicação raramente levam as pessoas envolvidas a procurarem tratamento clínico, fazendo com que o índice de hospitalização, e conseqüente notificação, seja relativamente baixo. No Brasil, os dados oficiais são ainda mais limitados, pois, além de ser considerada uma doença de notificação não compulsória, estudos que determinam a incidência dos variados tipos de enterotoxinas e o caráter endêmico e/ou epidêmico da doença ainda são considerados escassos em algumas regiões do país. Além disso, o frequente erro de diagnóstico dos profissionais de saúde, equívocos na coleta das amostras para testes laboratoriais e as investigações epidemiológicas inadequadas ou inconclusivas acabam por agravar este panorama (DIAS et al., 2011).

2.3.2.1. *Staphylococcus aureus*

Os produtos derivados de leite cru podem conter uma alta percentagem de contaminação com *Staphylococcus aureus* (CREMONESI et al., 2007; ROSENGREN et al., 2010). No Brasil, em 1999, houve um surto de intoxicação alimentar por *S. aureus* envolvendo 50 pessoas pela ingestão de queijo tipo Minas contaminado (do CARMO et al., 2002). Também, na Suíça, em 2014, foi relatado um surto de intoxicação alimentar por *S. aureus* envolvendo 14 pessoas (JOHLER et

al., 2015). Na França, entre 2006 e 2009, 3.127 surtos de intoxicação alimentar foram reportados às autoridades sanitárias, com acometimento de 33.404 pessoas, dentre as quais 15 foram a óbito. *S. aureus* foi o segundo agente mais prevalente nesses surtos (16%), ficando atrás somente de *Salmonella* spp.. No entanto, *S. aureus* foi considerado o agente mais frequentemente associado aos casos suspeitos e não confirmados de intoxicação alimentar (37,9%). Nesse mesmo estudo, em 2009, as enterotoxinas estafilocócicas foram mais frequentemente associadas à ocorrência de 1.255 surtos de intoxicação alimentar (DELMAS et al., 2010). Em ambos os relatos, os locais de origem dos surtos de intoxicação estafilocócica foram predominantemente ambiente familiar e estabelecimentos comerciais, enquanto os alimentos mais associados foram refeições prontas para o consumo e derivados lácteos.

A presença de *S. aureus* em queijos produzidos a partir de leite cru é uma preocupação de segurança microbiológica somente quando em população maior do que 10^2 UFC/g e/ou quando produz enterotoxinas. As enterotoxinas estafilocócicas são reconhecidas como agentes de intoxicação alimentar e podem estar envolvidas em outros tipos de infecções com sequelas de choque em seres humanos e animais. São nove principais tipos de enterotoxinas estafilocócicas, sendo que as cinco clássicas são *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e as outras quatro *seg*, *seh*, *sei* e *sej*. A *sec* ainda é subdividida em três subclasses *sec1*, *sec2* e *sec3*, com base em seus pontos isoelétricos (ROSEC; GIGAUD, 2002). Entre as toxinas, *sed* foi a única encontrada em isolados de *S. aureus* de queijos feta e Galotti, ambos produzidos a partir de leite cru de ovinos (PEXARA et al., 2012).

Uma investigação epidemiológica demonstrou, com o auxílio de técnicas moleculares, a primeira ocorrência de um surto alimentar causado pela enterotoxina E, veiculada através de queijos produzidos com leite cru (OSTYN et al., 2010). Um surto alimentar de proporções muito elevadas ocorreu na cidade de Osaka, no Japão, em 2000, com acometimento de 13.420 pessoas, devido ao consumo de leite em pó contaminado com pequenas quantidades de *sea* e *seh* (ASAO et al., 2003; IKEDA et al., 2005). No Paraguai, um surto de intoxicação alimentar causado pela ingestão de leite UAT recontaminado, após o processamento térmico, com *S. aureus* produtor de *sec* e *sed* foi divulgado abrangendo três cidades distintas e afetando

mais de 400 pessoas. Neste surto, foi possível verificar a similaridade genética, a capacidade de produção de enterotoxinas *in vitro* e a presença dos genes correspondentes nos isolados de *S. aureus* obtidos dos indivíduos acometidos pela intoxicação, do alimento incriminado e do funcionário responsável pela origem do surto (WEILER et al., 2011).

2.3.2.2. *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS)

Staphylococcus spp. resistentes à meticilina (MRS) representam risco à saúde pública, pois o uso indiscriminado da meticilina proporcionou a emergência de estirpes resistentes à recém-sintetizada penicilina beta-lactamase precursora do grupo da meticilina e oxacilina. A espécie MRS mais citada é o *Staphylococcus aureus* (MRSA). A detecção da MRS em unidades veterinárias de diferentes países (VAN DUIJKEREN et al., 2004; WEESE et al., 2004) e a probabilidade de transmissão entre os animais e o ser humano (JUHA'SZ-KASZANYITZKY et al., 2007) demonstraram a importância de monitorar tais microrganismos e o seu nível de resistência antimicrobiana.

Embora as linhagens de MRSA não sejam comumente relatadas em animais, sua presença tem sido reportada (RICH et al., 2005). De 90 isolados de *S. aureus* presentes no leite obtido de animais com casos de mastite bovina, 41 apresentaram o gene *mecA*, evidenciando a potencial resistência à meticilina e, dentre os isolados positivos, 21 apresentaram de fato resistência à meticilina no teste de sensibilidade *in vitro* (GUIMARÃES, 2011). A presença desta espécie bacteriana em animais pode ser fonte de contaminação do leite e de seus derivados.

Isolados MRSA obtidos de vários tipos de alimentos, incluindo carne de suínos, bem como no leite bovino e queijo (NORMANNO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009.; PU et al., 2009). Normanno et al. (2007), por exemplo, obtiveram 166 isolados de *S.aureus* enterotoxigênicos de alimentos de origem animal (leite, queijos, carne e derivados de carne), e destes, seis isolados de amostras de leite e queijos apresentaram o gene *mecA*. Lee (2003) também encontrou 15 estirpes de *S. aureus* contendo o gene *mecA*, sendo a maioria isolada de leite. O autor concluiu que alimentos de origem animal contaminados representam fonte de contaminação

para humano, e uma possível transmissão desses agentes pelos queijos é um fato a ser considerado.

Outros pesquisadores também ressaltaram o risco da presença de *Staphylococcus* resistentes à meticilina para a saúde dos consumidores de leite e seus derivados (DIAS et al., 2011) após identificarem a presença do gene *mecA*, específico de MRS, em 11,0% das amostras de leite analisadas. A importância da presença de MRS e MRSA em ambientes rurais e alimentos se fundamenta na possível infecção de consumidores e pessoas que entram em contato com animais, que acabam se tornando fonte de infecção destes agentes patogênicos. Tal importância foi evidenciada no trabalho de Van Rijen et al. (2008), que sugeriu que produtores que têm contato com suínos e bezerros têm grande risco de serem portadores de MRSA.

Muitos métodos moleculares têm sido empregados em investigações epidemiológicas de isolados de *Staphylococcus* spp. de bovinos e humanos. Dentre os marcadores moleculares utilizados para análise de diversidade, o RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) é uma técnica que pode fornecer resultados muito informativos acerca da diversidade genética de microrganismos (WILLIAMS et al., 1990). Esta técnica é baseada no uso de oligonucleotídeos iniciadores de sequências curtas, geralmente de 10 bases, que são pareados aleatoriamente no genoma, não necessitando do conhecimento prévio da sequência-alvo. A região compreendida entre dois oligonucleotídeos iniciadores hibridizados é amplificada arbitrariamente, gerando diferentes tamanhos de fragmentos amplificados. O número e a localização desses fragmentos variam de acordo com o genoma de cada organismo. Tais fragmentos amplificados são separados em gel de agarose por eletroforese, gerando um perfil genético característico para cada isolado microbiano ou amostra analisada. Uma única substituição de bases, inserções ou deleções pode alterar o pareamento do primer, tendo como consequência padrões de bandas diferentes (POWER, 1996; TENOVER et al., 1997; OLIVE; BEAN, 1999). Tal técnica é considerada rápida, de baixo custo e de fácil execução, no entanto, deve ser padronizada de forma a manter as mesmas características em todas as reações (ADZITEY et al., 2013).

O RAPD permanece sendo empregado em estudos de diversidade genética

de plantas, animais e, principalmente, de microrganismos, incluindo aqueles de origem alimentar e de risco à saúde pública (LAMARE; RAO, 2015; ŞAKALAR; ARMAN, 2015; EFTEKHAR; NOURI, 2015; ZEINALI et al., 2015). Este marcador ainda é considerado um dos mais discriminatórios quando comparados com outros, tais como ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (LAMARE; RAO, 2015) e PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) (GHAZI et al., 2016). O RAPD também tem se mostrado discriminatório na análise de diversidade genética de isolados de *Staphylococcus*, inclusive MRS (REINOSO et al., 2004; IDIL; BILKAY, 2014).

A busca de MRS em diferentes pontos da obtenção do leite e produção dos queijos tipo Minas frescal elaborados em propriedades leiteiras e a análise da sua diversidade genética são importantes para a elucidação da sua epidemiologia. Tais análises podem contribuir para a tomada de iniciativas no controle desses patógenos e a implantação de medidas visando evitar sua disseminação.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *E. coli* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, caracterizar os isolados nos patótipos EAEC, EIEC, ETEC, EPEC, STEC e ExPEC, pesquisar genes de virulência e o agrupamento filogenético ao qual pertencem, testar sua sensibilidade a antimicrobianos, estabelecer a relação epidemiológica entre os isolados por MLST e PFGE, pesquisar genes de resistência a antimicrobianos e classifica-los em sorogrupos;
- Isolar *Listeria* spp. e detectar as espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* de diferentes pontos da obtenção do leite e elaboração de queijos tipo Minas frescal, além de detectar genes de virulência nos isolados de *L. monocytogenes*;
- Isolar *Staphylococcus aureus* de amostras de diferentes pontos da obtenção do leite e elaboração de queijos tipo Minas frescal e detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas;
- Isolar *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina de diferentes pontos da obtenção do leite e elaboração de queijos tipo Minas frescal e caracterizar os isolados por sensibilidade a antimicrobianos, sequenciamento gênico e análise

de diversidade genética.

4. REFERÊNCIAS

ADZITEY, F., HUDA, N., ALI, G.R.R., Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. **Biotech.** 3, 97–107. 2013.

ALAIS, C. Ciencia de la leche. **Principios de Técnica Lechera**, Traducido por Don Antonio Lacasa Godina, Barcelona - España, Ed. Reverté, 2003.

ALMEIDA FILHO, E. S., NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. São Paulo: **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 71-73, 2002.

ALMEIDA, P. M. P. de. FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e Coliformes Fecais. São Paulo: **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n. 111, p. 79-85. ago, 2003.

ARAÚJO, J. M., TABARELLI, G. F., ARANDA, K. R. S., FABBRICOTTI, S. H., FAGUNDES- NETO, U., MENDES, C. M. F., SCALETSKY, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 45 no. 10, p. 3396-3399, 2007.

ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K., NAKAZAWA, H., KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low- fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection** 130, 33-40. 2003.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology** 61, 1 - 10. 2000.

BARBOSA, L.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Incidência de *Staphylococcus coagulase* positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Revista Higiene Alimentar**. v. 21, n. 148, p. 105 – 109. jan/fev, 2007.

BARROS, P. C. O. G. de.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. de J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. São Paulo: **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 57-61, jul, 2004.

BARTOLOMEU, D.A.F.S.; DALLABONA, B.R.; MACEDO, R.E.F.; KIRSCHNIK, P.G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia

(*Oreochromis niloticus*). Archives of Veterinary Science, Curitiba, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BIDET, P.; KURKDJIAN, P. M.; GRIMONT, F. et al. Characterization of *Escherichia coli* O 157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. **Journal Medical Microbiology**, v. 54, p. 71-75, 2005.

BINGEN, E., B. PICARD, N. BRAHIMI, S. MATHY, P. DESJARDINS, J. ELION, AND E. DENAMUR. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **Journal Infectious Diseases**. 177: 642–650, 1998.

BONFOH, B., WASEM A., TRAORÉ A.N., FANÉ A., SPILLMANN H., SIMBÉ C.F., ALFAROUKH I.O., NICOLET J., FARAH Z., ZINSSTAG J. Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, v. 14, n. 7, p. 495-500, 2003.

BORELLI, B. M., FERREIRA, E. G., LACERDA, I. C. A., FRANCO, G. R., & ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22, 1115e1119., 2006.

BORGES, C.A., BERALDO, L. G., MALUTA, R. P., CARDOZO, M. V., GUTH, B. E., RIGOBELLO, E. C., de AVILA, F. A. Shiga toxicogenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 9, n.12, p. 1119-25, 2012.

BOYD, E. F., AND D. L. HARTL. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**. 180:1159 – 1165. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Ofício Circular DIPOA no 12/09. **Diretrizes para a aplicação dos procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos prontos para o consumo**, previstos na Instrução Normativa No 9, de 9 de abril de 2009, 2009.

BRITO, J. R.F., SANTOS, E. M. P. ARCURI, E. F., LANGE, C. C., BRITO, M. A.V.P., SOUZA, G., N., CERQUEIRA, M. M. P. O, BELTRAN, J. M. S., CALL, J. E., LIU, Y., PORTO-FETT, A. C. S., LUCHANSKY, J. B. Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant To Establish Prevalence, Relatedness, and Sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. **Applied and environmental microbiology**, p. 4954–4961 Vol. 74, No. 15, 2008.

CAMPOS, M. R. J. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. da. S.; JAYME, L. B., SANTOS, P. P. SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e

de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, jul./ago, 2006.

CANIZALEZ-ROMAN, A., A.; GONZALEZ-NUÑEZ, E.; VIDAL, J.E.; FLORES-VILLASEÑOR, H.; LEÓN-SICAÍROS, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern México. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 36-45, 2013.

CARDOSO, L., ARAÚJO, W.M.C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 18, n.123, p. 49-53 ago, 2004.

CARLOS, C., PIRES, M. M., STOPPE, N. C., HACHICH, E. M., SATO, M. I. Z., GOMES, T. A. T., AMARAL, L. A. OTTOBONI, L. M. M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**, **10**:161, 2010.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, A. F. de O setor lácteo em perspectiva. Boletim de conjuntura agropecuária. Campinas: **Embrapa Monitoramento por Satélite**, 23 p. Setembro de 2006.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection** 66, 1693-1696. 2003.

CHROMIK, C., PARTSCHEFELD, C., JAROS, D., HENLE, T., & ROHM, H. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: a case study. **Journal of Food Engineering**, 100(3), 496e503. 2010.

CHYE, F., ABDULLAH, A., AYOB M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia, **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 535–541, 2004.

CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y., HERMAN, L.. Raw or heated cow 451 milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**. 452;31:251–262. 2013.

CREMONESI, P., PEREZ, G., PISONI, G., MORONI, P., MORANDI, S., LUZZANA, M., BRASCA, M., CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, 45, 586e591. (2007).

de SANTANA, E.H.W., BELOTI, V., ARAGON-ALEGRO, L.C., DE MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico** 77, 545-554. 2010.

DELGADO DA SILVA, M. C., E. HOFER, AND A. TIBANA. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food**

Protection 61:354–356. 1998.

DELMAS, G., DA SILVA, N.J., PIHIER, N., WEILL, F.-X., VAILLANT, V., DE VALK, H. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire** 31-32, 344-348. 2010.

DIAS, N.L.; SILVA, D.C.B.; OLIVEIRA, A D.C.B.S.; FONSECA JUNIOR, A.A.; SALES, M.L.; SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews** 13, 16 - 34. 2000.

do CARMO, L. S., DIAS, R. S., LINARDI, V. R., DE SENA, M. J., DOS SANTOS, D. A., DE FARIA, M. E., PENA, E. C., JETT, M., HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, 19, 9e14. 2002

DOMINGUEZ, M., JOURDAN-DA SILVA, N., VAILLANT, V., PIHIER, N., KERMIN, C., WEILL, F. X., DELMAS G., KEROUANTON A., BRISABOIS A., DE VALK H. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Montevideo infections in France linked to consumption of cheese made from raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6, 121e128. 2009.

DUARTE, D. A., SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2005.

EFTEKHAR, F.; NOURI, P. Correlation of RAPD-PCR Profiles with ESBL Production in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, 1–3, 2015.

EMBRAPA. Imprensa. Notícias - 2011. **Embrapa promove simpósio sobre queijos artesanais do Brasil**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 26/07/2016.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F., NASSU, R. T., AZEVEDO, E. H. I. de., MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23. suppl., p. 162-165, 2003.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F.de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.144, p.4-56, set., 2006.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 496p. 2010.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol. 2. 2. ed. London: Chapman & Hall, 601p. 1993.

FOXMAN, B.; RILEY, L. W. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, p. 1135-1141, 2001.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2002.

FRECE, J., MARKOV, K., CVEK, D., KOLAREC, K., DELAS, F.. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of Dairy Research**, London, v. 77, n. 1, p. 112-116, fevereiro 2010.

GALIA, W., MARIANI-KURKDJIAN, M., LOUKIADIS, E., BLANQUET-DIOT, S., LERICHE, F., BRUGÉRE, H., SHIMA, A., OSWALD, E., COURNOYER, B., THEVENOT-SARGENTET, D., Genome sequence and annotation of a human infection isolate of *Escherichia coli* O26:H11 involved in a raw milk cheese outbreak. **Genome Announc.** 3, e01568-14. (2015).

GAULIN, C., RAMSAY, D., BEKAL, S. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. **Journal of Food Protection**, 75, 71e78. 2012.

GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S.; **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**; 3.ed, Manole, Barueri, p. 310-317, 2008.

GHAZI, F.; KIHAL, M.; ALTAY; GÜRAKAN, G. C. Comparison of RAPD-PCR and PFGE analysis for the typing of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Turkish yogurts. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1013-1026, 2016.

GIRARDEAU, J.P.; DALMASSO, A.; BERTIN, .;Y DUCROT, C.; BORD, S.; LIVRELLI, V.; NERNOZY-ROZAND, C.; MARTIN, C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.12, p. 6098–6107, 2005.

GUILLET, C., JOIN-LAMBERT, O., LE MONNIER, A., LCCLERCQ, A., MECHAÏ, F., MAMZER-BRUNEEL, M. F., BIELECKA, M. K., SCORTTI, M., DISSON, O., BERCHE, P., VAZQUEZ-BOLAND, J., LORTHOLARY, O., LECUIT, M. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 16, No. 1, 2010.

GUIMARÃES, F.F. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene meca de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de**

enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas. Dissertação de Mestrado. FMVZ-Unesp/Botucatu. 2011.

HALL WF, FRENCH N. **An Assessment of Available Information on 458 Raw Milk Cheeses and Human Disease 2000–2010.** Wellington: 459 Ministry of Agriculture and Forestry; 2011.

HERZER, P. J., S. INOUE, M. INOUE, AND T. S. WHITTAM. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v .172, p.6175–6181, 1990.

HOFFMANN, F.L.; GONÇALVES, T.M.V.; COELHO, A.R.; HIROOKA, E.Y.; HOFFMANN, P. Qualidade microbiologia de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São José do Rio Preto, SP. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 18, n.122, p. 62-66, jul. 2004.

HONISH, L., PREDY, G., HISLOP, N., CHUI, L., KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K., TROTTIER, L., KREPLIN C., ZAZULAK I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. **Canadian Journal of Public Health**, 96, 182e184. 2005.

IDIL, N.; BILKAY, I. S. Application of RAPD-PCR for Determining the Clonality of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Hospitals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n.4, p. 548-553, 2014.

IKEDA, T., TAMATE, N., YAMAGUCHI, K., MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology** 71, 2793-2795. 2005.

INDRAWATTANA, N. ; NIBADDHASOBON, T . Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. **Journal Health Population and Nutrition**. 29:26-38, 2011.

JAKOBSEN, L. KURBASIC, A., SKJØT-RASMUSSEN, L., EJRNÆS, K., PORSBO, L. J., PEDERSEN, K., JENSEN, L. B., EMBORG, H., AGERSØ, Y., OLSEN, K. E. P., AARESTRUP, F. M., FRIMODT-MØLLER, N., HAMMERUM, A. M.. *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chicken Meat, Broiler Chickens, Pork, and Pigs Share Phylogroups and Antimicrobial Resistance with Community-Dwelling Humans and Patients with Urinary Tract Infection. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 7, n. 5, 2010.

JANA, K.H.; XAVIER, D.; MARC, L.; HANNU, K.; MARK,A. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones:a large-scale Multilocus Sequence Typing study. **Environmental Microbiology** 16(2), 405–416. 2014.

JOHLER, S., WEDER, D., BRIDY, C., HUGUENIN, M. C., ROBERT, L.,

HUMMERJOHANN, J., Stephan, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, 98, 2944e2948. 2015.

JOHNSON, J. R., RUSSO, T.A. J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *Escherichia coli*". **Lab, Clin. Med.**, v. 139, n. 3, p. 155-162, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infectious Disease**. v.18, P.261–272. 2000.

JUHA'SZ-KASZANYITZKY, E' ., S. JA'NOSI, P. SOMOGYI, A. DA'N, L. VAN DER G. BLOOIS, E. VAN DUIJKEREN, AND J. A. WAGENAAR,: MRSA Transmission between Cows and Humans. **Emerging Infections Diseases**. v.13, p.630–632, 2007.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**; 2:123–140. 2004.

KOSIKOWSKY, F. **Cheese and fermented milk foods**. New York: Cornell University, 429p. 1970.

KOTTWITZ, L. B. M. & GUIMARÃES, I. M. Avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no Estado do Paraná. São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n. 114/115, p. 77-80, 2003.

KOUSTA, M., MATARAGAS, M., SKANDAMIS, P., DROSINOS, E. H., Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at the farm and processing levels. **Food Control**. v. 21, p. 805- 815. 2010.

LAMARE, A.; RAO, S. R. Efficacy of RAPD, ISSR and DAMD markers in assessment of genetic variability and population structure of wild *Musa acuminata colla*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 3, p. 349–358, 2015.

LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research** 2, 63-76. 2003.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DARLU, P.; DENAMUR, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. **Molecular Biology and Evolution**,15: 1685-1695, 1998.

LEE, J.H.. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology** 69, 6489–6494, 2003.

LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 89-93, jun. 2005.

LIMA, C. D. C., LIMA, L. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., FERREIRA, E. G., ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 61, 266e272, 2009.

LINKE, K.; IRENE RÜCKERL, BRUGGER, K.; KARPISKOVA' R.; WALLAND, J.; MURI- KLINGER, S.; ALEXANDER TICHY, A.; WAGNER, M. ; STESSL, B. Reservoirs of Listeria Species in Three Environmental Ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, 80 (18) 2014.

LIPTAKOVA, A., SIEGFRIED, L., ROSOCHA, J., PODRACKA, L., BOGYIOVA, E., KOTULOVA, D. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurized cow's milk in Slovakia. **Clin. Microbiol. Infec.** 10, 574-592. (2004).

LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Revista Ciência Rural**, v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

MAIDEN, M.C., BYGRAVES, J.A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J.E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D.A., FEAVERS, I.M., ACHTMAN, M., SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, 1998.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.de.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp isoladas de carne moída bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.45, n.2, p. 116-121, 2008.

MENEZES, L.D.M.; PENA, E.C.; SOUZA, V.F. et al. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. **Anais do XVI Encontro Nacional E li Congresso Latino- Americano De Analistas De Alimentos**. Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009.

Minas Gerais, **lei nº 14.185, de 31 de Janeiro de 2002**. Disponível em: http://www.ima20anos.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf Acessado em 2 de Junho de 2016.

NETTO, D. P., LOPES, M. O. OLIVEIRA, M. C. S., NUNES, M. P., JUNIOR, M. M., BOSQUIROLI, S. L., BENATTO, A., BENINI, A., BOMBARDELLI, A. L. C., FILHO, D. V., MACHADO, E., BELMONTE, I. L, ALBERTON, PEDROSO, P. P., SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA, S.G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology** v.117,p. 219-222, 2007.

OKURA, M. H. A contaminação em salgados (coxinhas) encontrados no centro da cidade de Uberaba, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, Jun. 2005.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 1661- 1669, 1999.

OMBARAK, R.A., HINENOYA, A., AWASTSHI, S.P., IGUCHI, .A. SHIMA, A., ELBAGORY, A.R.M., YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Int. J. Food Microbiol.** **221**, 69-76. (2016).

OSTYN, A., DE BUYSER, M.-L., GUILLIER, F., GROULT, J., FÉLIX, B., SALAH, S., DELMAS, G., HENNEKINNE, J.A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Eurosurveillance** 15, 1-4. 2010.

PANETO, B. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M.; Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**. v. 26, p. 278-282, 2009.

PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. **Journal Of Clinical Microbiology**, Nov., v. 41, n. 11, p. 5308–5309, 2003.

PEXARA, A., SOLOMAKOS, N., SERGELIDIS, D., GOVARIS, A. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in Feta and Galotyri cheeses. **Journal of Dairy Research**, 79, 405e413. (2012).

PICARD, B., J. S. GARCIA, S. GOURIOU, P. DURIEZ, N. BRAHIMI, E. BINGEN, J. ELION, AND E. DENAMUR. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and Immunity**. v. 67, p.546–553.

POWER, E. G. M. RAPD typing in microbiology – a technical review. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 34, p. 247-265, 1996.

PU, S., HAN, F., GE, B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 265-267, 2009.

QUINN, P. J; MARKEY, B. K; CARTER, M.E; DONNELLY, W. J; LEONARD, F. C.; **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed: Porto Alegre, p. 83-86, 2005.

RANTSIOU, K.; MATARAGAS, M.; ALESSANDRIA, V.; COCOLIN, L. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 161-168, 2012.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, S.N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** Belo Horizonte. v, 56, n.1, p. 130-133, 2004.

REGUA-MANGIA, A.H.; BEZERRA, R.M.P.; ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**. 38: 27-34,. 2009.

REINOSO, E.; BETTERA, S.; FRIGERIO, C.; DIRENZO, M.; CALZOLARI, A.; BOGNI, C. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. **Microbiology Research**, v. 159, n.3, p. 245-255, 2004.

RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.237-240, 2005.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo de Minas Frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 2, p. 236-272, 2006.

ROCOURT, J., H. HOF, A. SCHRETTENBRUNNER, R. MALINVERNI, AND J. BRILLE. Meningite purulente aigüe à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompetent. **Schweiz. Med. Wochenschr.** 116:248–251. 1986.

ROSEC, J.P. GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n.1-2: 61-70, 2002.

ROSENGREN, A., FABRICIUS, A., GUSS, B., SYLVE N, S., LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, 144, 263 - 269. 2010.

RUSSO T.A., JOHNSON J. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. **Journal Infectious Disease**, v. 181, p. 1753–1754, 2000.

ŞAKALAR, E.; ARMAN, K. A new RAPD-PCR based analytical assay for detection of sea bass and sea bream treated with ionizing radiation. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1233–1237, 2015.

SALOTTI, B. M., CARVALHO, A.C.F.B., AMARAL, L.A., VIDAL-MARTINS, A.M.C,

CORTEZ, A.L. Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Comercializado No Município De Jaboticabal, Sp, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, abr./jun., 2006.

SANTOS, A. C. M., PIGNATARI, A.C.C., SILVA, R.M.; ZIDKO, A.C.M.; GALES, A.C. A Virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SCHMID-HEMPEL, P., FRANK, S.A., **Pathogenesis, virulence, and infective dose.** PLoS Pathog. 3 (10), e147. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030147>. 2007.

SELANDER R. K., CAUGANT D. A., WHITTAM T. S. **Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*.** eds Neidhardt F. C., Ingraham K. L., Magasanik B., Low K. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.) pp 1625–1648, 1987.

SEO, K.S., BOHACH, G.A. ***Staphylococcus aureus*.** In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 3 ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 493-518. 2007.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 624p., 2010.

SMITH, J. L. FRATAMICO, P.M., GUNTHER, N.W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.** , v. 2, n. 4, p. 134-163, 2007.

STELLA, A. E., MALUTA, R. P., RIGOBELLO, E. C., MARIN, J. M., de ÁVILA, F. A., Virulence Genes in Isolates of *Escherichia coli* from Samples of Milk and Feces from Dairy Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1698-1700, 2012.

STRACHAN, N. J. C., DUNN, G. M., MARY, E., LOCKING, M. E., REIS, T. M. S., OGDEN, I. D.. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 112, 129e137. 2006.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, New Jersey, v. 18, p. 426-439, 1997.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L.; **Microbiologia**, 8. ed. Artmed, Porto Alegre, p. 619- 620, 2005.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-87, Oct 2003.

VAN CAUTEREN, D., JOURDAN-DA SILVA, N., WEILL, F. X., KING, L., BRISABOIS, A., DELMAS, G., VAILLANT, V., VALK, H. Outbreak of Salmonella enterica serotype Muenster infections associated with goat's cheese, France, March 2008. **Eurosurveillance**, 14, 19290. 2009.

VAN DUIJKEREN, E., A. T. BOX, M. E. HECK, W. J. WANNET, AND A. C. FLUIT, Methicillin- resistant Staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**. n. 103, p. 91–97. 2004.

van RIJEN, M. M. L.; VAN KEULEN, P. H.; Kluytmans, J. A. Increase in a Dutch Hospital of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Related to Animal Farming. **Clinical Infectious Diseases**, 46:261–3, 2008.

WEESE, J. S., T. DACOSTA, L. BUTTON, K. GOTH, M. ETHIER, AND K. BOEHNKE, Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from the environment in a veterinary teaching hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 18, p. 468–470, 2004.

WEILER, N., LEOTTA, G.A., ZARATE, M.N., MANFREDI, E., ALVAREZ, M.E., RIVAS, M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. **Revista Argentina de Microbiología** 43, 33-36. 2011.

WILLIAM, F. H. An assessment of available information on raw milk cheeses and human disease. **MAF Technical Paper** No: 2011/58. 2011.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. AND TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18, 6531-6535, 1990.

ZANELLA, G. N., MIKCHA, J. M. G., BANDO, E., SIQUEIRA, V. L. D., MACHINSKI M. Occurrence and Antibiotic Resistance of Coliform Bacteria and Antimicrobial Residues in Pasteurized Cow's Milk from Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 73, n.9, p. 1684–1687, 2010.

ZEINALI, T.; JAMSHIDI, A.; RAD, M.; BASSAMI, M. A comparison analysis of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 6, p. 10152-10157, 2015.

CAPÍTULO 2 – Caracterização genotípica e análise epidemiológica de isolados de *Escherichia coli* detectados em diferentes pontos da obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado

RESUMO – Além de *E. coli* comensais, existem as diarreio gênicas que ocasionam infecção intestinal e diarreia em humanos e aquelas que causam lesões extra-intestinais. Os diferentes grupos de *E. coli* podem estar presentes no leite e seus derivados, que podem servir como veiculadores de estirpes resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções em humanos. A fim de conhecer as fontes de contaminação do leite e de queijos elaborados a partir de leite cru, este estudo objetivou isolar *E. coli* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, detectar os patótipos EAEC, EIEC, ETEC, EPEC, STEC, ExPEC e caracterizar os isolados pela pesquisa de genes de virulência, agrupamento filogenético, teste de sensibilidade a antimicrobianos, estabelecer a relação genética e epidemiológica entre os isolados por PFGE e MLST, pesquisar genes de resistência a antimicrobianos e classificá-los em sorogrupos. Para tanto, foram realizadas coletas em cinco pequenas propriedades rurais produtoras deste tipo de queijo no nordeste do Estado de São Paulo. Foram coletadas amostras de suabes de fezes bovinas, amostras de mãos de ordenhador, balde, leite, soro, água, superfície de elaboração de queijos, mãos de manipulador do queijo, peneiras, bandejas, fôrmas e escumadeiras. Foram montadas três coleções de *E. coli*, patogênicas, comensais e resistentes à ceftriaxona (ESBL). Nas amostras de leite e queijo foram encontrados isolados potencialmente patogênicos como STEC e ExPEC. Os isolados de *E. coli* foram pertencentes, em sua maioria, aos grupos filogenéticos A e B1. Tais isolados apresentaram resistência antimicrobiana principalmente ao ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, estreptomina, sulfisoxazole e tetraciclina. A análise de similaridade genética por PFGE indicou que isolados de *E. coli* da mesma propriedade contendo o mesmo gene de virulência circularam em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos tipo Minas frescal. O sorogrupo mais encontrado foi o O18 e, segundo o MLST, foram obtidos isolados ST131, os quais estão associados a estirpes potencialmente patogênicas. Assim, conclui-se que isolou-se *E. coli* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, detectou-se EPEC, STEC, ExPEC, encontrou-se importantes grupos filogenéticos como B2, D e F, isolados com alta resistência antimicrobiana e com genes de resistência. Ademais, detectou-se importantes sorogrupos e importantes ST's. Demonstrou-se a relação genética e epidemiológica entre os isolados, mostrando que os mesmos estão circulando entre os diferentes pontos de coleta. Conclui-se também que a contaminação de *E. coli* potencialmente patogênicas e com resistência a antimicrobianos no leite e no queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru vem de diferentes fontes de contaminação, o que oferece um potencial risco à saúde pública.

Palavras-chave: Grupo filogenético, resistência antimicrobiana, PFGE, MLST, sorologia

1. INTRODUÇÃO

E. coli associadas à infecção intestinal e causadoras de diarreia em humanos são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e são classificadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC), shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004).

Os diferentes grupos de *E. coli* diarreiogênicas podem estar presentes em derivados de leite, como reportado em um estudo realizado no Egito, o qual investigou a presença de *E. coli* potencialmente patogênica em amostras de leite cru e queijos dos tipos “Karish” e “Ras”, reportou prevalência de *E. coli* diarreiogênica (DEC) e ExPEC em 36,9% das amostras investigadas e 46,8% possuíam um ou mais genes de virulência (OMBARAK et al., 2016).

Ademais, alimentos de origem animal servem como fonte de patógenos resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções por microrganismos resistentes em humanos (BARBOSA; JORGE; UENO; 2007). Um estudo de isolados de *E. coli* potencialmente patogênicas oriundos de amostras de leite cru e de queijos elaborados a partir de leite cru no Irã mostrou que os isolados apresentaram resistência a oxitetraciclina, cefalexina, ácido nalidíxico, ao nitrofurantoin, gentamicina e ao trimethoprim-sulfametoxazole (BONYADIAN; MOSHTAGHI; TAHERI, 2014).

Faz-se necessários estudos epidemiológicos para estabelecer a origem das contaminações dos alimentos, utilizando técnicas de tipagem bacteriológica, pelas quais estabelecem-se relações genéticas entre isolados de diferentes pontos da cadeia produtiva de alimento, animais, manipuladores, equipamentos, entre outros (FOXMAN; RILEY, 2001). Assim, o objetivo deste trabalho foi de isolar *E. coli* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, detectar os patótipos EAEC, EIEC, ETEC, EPEC, STEC, ExPEC e caracterizar os isolados pela pesquisa de genes de virulência, agrupamento filogenético, teste de sensibilidade a antimicrobianos, estabelecer a relação genética e epidemiológica entre os isolados por PFGE e MLST, pesquisar genes de resistência a

antimicrobianos e classificá-los em sorogrupos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas em cinco pequenas propriedades leiteiras (Figura 1), produtoras de queijos elaborados a partir de leite cru refrigerado, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, durante os meses de janeiro a março de 2014. As propriedades foram nomeadas em A, B, C, D e E. A amostragem foi realizada segundo preconizado por Kousta et al. (2010).



Figura 1. Ilustrações da obtenção do leite nas propriedades leiteiras, produtoras de queijos elaborados a partir de leite cru refrigerado, amostradas na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, durante os meses de janeiro a março de 2014.

Em cada propriedade visitada, no dia da coleta, a ordenha e a produção dos queijos foram acompanhados.

A propriedade A possuía 15 animais sem raça definida (SRD), alguns com mastite clínica (ordenhador eliminava os primeiros jatos de leite no chão e observava-se a presença de grumos). Nesta propriedade, as ordenhas eram realizadas manualmente, por uma única pessoa, duas vezes ao dia, em curral descoberto e não pavimentado. O curral de recepção dos animais era o mesmo da ordenha. Anteriormente à ordenha, não eram realizados os testes da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT). Os tetos não eram limpos, apesar de haver água disponível no curral e, o *pré-dipping* não era realizado. Após a ordenha, o *pós-dipping* também não era realizado. Imediatamente após a ordenha, o leite era peneirado e levado para a produção de queijo, sem passar por refrigeração. Todo o leite obtido na propriedade era destinado à produção de queijos tipo Minas frescal. A elaboração dos queijos era realizada na cozinha da propriedade, pela mesma pessoa que realizava a ordenha, sem utilização de luva, de touca, sem troca de roupa, apenas uma lavagem rápida das mãos. A água da sala de elaboração de queijo era proveniente da água de poço. O leite era esquentado no fogão e a temperatura ideal era mensurada pela sensação térmica dos dedos do manipulador. Utilizava-se coágulo industrial e, o excesso do soro era retirado com as mãos, na pia da cozinha. Os queijos eram então mantidos à temperatura ambiente, sem telas, até o momento da venda, normalmente para pessoas que encomendam os queijos nas propriedades. A coleta dos queijos foi feita no dia seguinte.

A propriedade B possuía dez animais sem raça definida (SRD), alguns com mastite clínica (ordenhador eliminava os primeiros jatos de leite no chão e observava-se a presença de grumos). Nesta propriedade, as ordenhas eram realizadas com equipamento “balde ao pé”, por uma única pessoa, duas vezes ao dia, em curral coberto e pavimentado. O curral de recepção dos animais não era o mesmo da ordenha. Anteriormente à ordenha, não eram realizados os testes da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT). Os tetos eram limpos apenas com água e, o *pré-dipping* não era realizado. Após a ordenha, o *pós-dipping* também não era realizado. O equipamento de ordenha de “balde ao pé” não era lavado ao final do uso. Imediatamente após a ordenha, o leite era peneirado e

levado para a produção de queijo, sem passar por refrigeração. Todo o leite obtido na propriedade era destinado à produção de queijos tipo Minas frescal. A elaboração dos queijos era realizada em uma cozinha externa à sede da propriedade, pela mesma pessoa que realizou a ordenha, sem utilização de luva, de touca, sem troca de roupa, apenas uma lavagem rápida das mãos. A água da sala de elaboração de queijo era proveniente da água de poço. O leite era esquentado no fogão e a temperatura ideal era mensurada pela sensação térmica dos dedos do manipulador. Utilizou-se coágulo industrial e, o excesso do soro era retirado com peneira e posteriormente com o auxílio de pano de prato. Os queijos eram então mantidos à temperatura ambiente, sem telas, até o momento da venda, normalmente para um supermercado da região de Jaoticabal. A coleta dos queijos foi feita no dia seguinte.

A propriedade C possuía cinco animais sem raça definida (SRD), todos com mastite clínica (ordenhador eliminava os primeiros jatos de leite no chão e observava-se a presença de grumos). Nesta propriedade, as ordenhas eram realizadas manualmente, por uma única pessoa, duas vezes ao dia, em curral descoberto e não pavimentado. O curral de recepção dos animais era o mesmo da ordenha. Anteriormente à ordenha, não eram realizados os testes da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT). Os tetos não eram limpos, pois nem mesmo havia água disponível no curral, e o *pré-dipping* não era realizado. Após a ordenha, o *pós-dipping* também não era realizado. Imediatamente após a ordenha, o leite era peneirado e levado para a produção de queijo, sem passar por refrigeração. Todo o leite obtido na propriedade era destinado à produção de queijos tipo Minas frescal. A elaboração dos queijos era realizada na cozinha da propriedade, por outra pessoa que não a mesma que realizou a ordenha, sem utilização de luva, de touca, sem troca de roupa e a água da sala de elaboração de queijo era proveniente da água de mina e rio. O leite era esquentado no fogão e a temperatura ideal era mensurada com termômetro à 37°C. Utilizou-se coágulo industrial e, o excesso do soro era retirado com o auxílio de uma colher grande na pia da cozinha. Os queijos eram então mantidos à temperatura ambiente, sem telas, até o momento da venda, normalmente para pessoas que encomendam os queijos nas propriedades. A coleta dos queijos foi feita no dia seguinte.

A propriedade D possuía oito animais sem raça definida (SRD), alguns com

mastite clínica (ordenhador eliminava os primeiros jatos de leite no chão e observava-se a presença de grumos). Nesta propriedade, as ordenhas eram realizadas manualmente, por uma única pessoa, duas vezes ao dia, em curral coberto e não pavimentado. O curral de recepção dos animais era o mesmo da ordenha. Anteriormente à ordenha, não eram realizados os testes da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT). Os tetos não eram limpos, pois nem mesmo havia água disponível no curral e, o pré-*dipping* não era realizado. Após a ordenha, o pós-*dipping* também não era realizado. Imediatamente após a ordenha, o leite era peneirado e levado para a produção de queijo, sem passar por refrigeração. O leite obtido na propriedade era destinado à venda de leite cru e à produção de queijos tipo Minas frescal. A elaboração dos queijos era realizada na cozinha da propriedade, por outra pessoa que não a mesma que realizou a ordenha, sem utilização de luva, de touca, sem troca de roupa, apenas uma lavagem rápida das mãos. A água da sala de elaboração de queijo era proveniente da água de poço. O leite era mantido no sol para aumentar a temperatura e esta era mensurada pela sensação térmica dos dedos do manipulador. Utilizou-se coágulo industrial e, o excesso do soro era retirado com as mãos, na pia da cozinha. Os queijos eram então mantidos à temperatura ambiente, sem telas, até o momento da venda, normalmente para pessoas que encomendam os queijos nas propriedades. A coleta dos queijos foi feita no dia seguinte.

A propriedade E possuía seis animais sem raça definida (SRD), todos com mastite clínica (ordenhador eliminava os primeiros jatos de leite no chão e observava-se a presença de grumos). Nesta propriedade, as ordenhas eram realizadas manualmente, por uma única pessoa, duas vezes ao dia, em curral coberto e não pavimentado. O curral de recepção dos animais era o mesmo da ordenha. Anteriormente à ordenha, não eram realizados os testes da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT). Os tetos não eram limpos, pois nem mesmo havia água disponível no curral e, o pré-*dipping* não era realizado. Após a ordenha, o pós-*dipping* também não era realizado. Imediatamente após a ordenha, o leite era peneirado e levado para a produção de queijo, sem passar por refrigeração. O leite obtido na propriedade era destinado à venda de leite cru e à produção de queijos tipo Minas frescal. A elaboração dos queijos era realizada na cozinha da

propriedade, por outra pessoa que não a mesma que realizou a ordenha, sem utilização de luva, além de não possuir as unhas aparadas e usar acessórios tais como anéis. Também não se utilizava touca, sem troca de roupa da ordenha para produção de queijo. A água da sala de elaboração de queijo era proveniente da água de poço. O leite era mantido no sol para aumentar a temperatura e esta era mensurada pela sensação térmica dos dedos do manipulador. Utilizou-se coágulo industrial e, o excesso do soro era retirado com as mãos, na pia da cozinha. Os queijos eram então mantidos à temperatura ambiente, sem telas, até o momento da venda, normalmente para pessoas que encomendam os queijos nas propriedades. A coleta dos queijos foi feita no dia seguinte.

As coletas de amostras foram realizadas na ordenha da manhã. Na sala de ordenha, de cada propriedade, coletou-se cinco amostras de fezes bovinas de animais com ou sem diarreia, sendo uma de cada animal, por meio de suabe retal. Além disso, coletou-se uma amostra de suabes das mãos do ordenador e uma de balde ou superfície interna da teteira, em caso de ordenha mecânica. No caso da presença de reservatório de água nestas salas, foram realizadas as coletas de amostras de água em frascos esterilizados com capacidade para 500 mL (APHA, 2001).

Imediatamente após o término de cada ordenha, coletou-se, do balde contendo o leite de todos os animais, amostras de leite com auxílio de conchas esterilizadas e, estas foram colocadas em frascos esterilizados com capacidade para 500 mL (BRITO et al., 1998). Na sala de elaboração de queijos coletou-se, inicialmente, suabe das mãos do manipulador/produtor dos queijos. Posteriormente, coletou-se a água da sala de produção dos queijos, também em frascos esterilizados com capacidade para 500 mL (APHA, 2001), suabes dos utensílios de produção do queijo, como peneira, talheres, fôrmas, dentre outros, suabes de superfícies de manipulação e, ao final, o soro do queijo também foi amostrado e depositado em frascos esterilizados com capacidade para 500 mL. Cada suabe colhido foi acondicionado em tubos contendo água peptonada estéril a 0,1%. Assim, foi coletado um suabe de cada ponto. Ilustrações da obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado encontra-se na figura 2.



Figura 2. Ilustração da produção de queijos Minas frescal elaborados a partir de leite cru na propriedade rural C amostradas na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, durante os meses de Janeiro a Março de 2014. A - Ordenha; B – Filtragem do leite; C – Utensílios utilizados para elaboração do queijo; D – Leite sendo esquentando no fogão e temperatura sendo mensurada com termômetro; E – Quebra do coalho; F – Início da dessoragem; G – Enformagem; H- Queijo na fôrma.

No dia seguinte da produção dos queijos, no qual estes estavam prontos para serem comercializados, dois queijos de cada propriedade foram coletados em sacos plásticos estéreis. Todas as amostras e os queijos foram transportados para o Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água, localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV- UNESP), em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável. As amostras foram processadas imediatamente após a chegada no laboratório.

No total, foram coletadas 106 amostras, sendo 22 da propriedade A, 23 da B, 21 da C, 21 da D e 19 da E.

2.2. Preparo das amostras para isolamento de *E. coli* (GILL et al., 2012)

Alíquotas de 100 mL das amostras de água foram filtradas em membrana filtrante esterilizada, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, segundo Vicente et al. (2006), imediatamente após a chegada no laboratório. Posteriormente, as membranas foram cortadas com tesoura esterilizada e depositadas em frascos contendo 50 mL de caldo soja tripticaseína (TSB), os quais foram incubados a 42°C por 4 h. Cada queijo foi cortado em vários pedaços, e amostras representativas foram unidas em uma amostra de 25 g a qual foi colocada em um saco estéril contendo 225 mL de caldo TSB. A mistura foi homogeneizada em Stomacher® por 2 min e transferida para frascos, os quais foram incubados a 42°C por 4h.

Alíquotas de 10 mL de soro dos queijos foram transferidas para frascos contendo 90 mL de caldo TSB, os quais foram incubados a 42°C por 4h. E, alíquotas de 25 mL de leite foram transferidos para frascos contendo 225 mL de caldo TSB, os quais foram incubados a 42°C por 4h. Já os tubos contendo os suabes (inclusive aqueles contendo fezes bovinas) e água peptonada foram agitados em vórtex no laboratório para uma homogeneização adequada. Em seguida, 1mL desta solução foi adicionado aos frascos contendo 5mL de caldo TSB, os quais também foram incubados a 42°C por 4h.

Após a multiplicação bacteriana, aos frascos contendo alíquotas de água, amostras de queijo e de soro, assim como aos tubos contendo cultura bacteriano de

suabes, foram adicionados os antibióticos vancomicina (10 µg/mL) e cefsulodina (3 µg/mL). Após o acréscimo dos antibióticos, os frascos foram novamente incubados a 42°C por 16 a 20h.

Após a incubação de todas as amostras, retiraram-se alíquotas de 700 µL de cada cultura, as quais foram congeladas a -80°C em uma solução de caldo BHI (brain heart infusion) contendo 20% de glicerol, para posteriores análises. Estas mesmas amostras foram semeadas para ágar nutriente e, após serem cultivadas foram transportadas ao Laboratório de *Escherichia coli* (EcL) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá, para análises fenotípicas e genotípicas dos isolados de *E.coli*.

2.3. Obtenção das coleções de *Escherichia coli*

Ao chegar ao Laboratório de *Escherichia coli* (EcL), foram montadas três coleções distintas de *E. coli* visando obter uma coleção de isolados comensais, uma coleção de isolados potencialmente patogênicos e outra coleção composta por isolados resistentes à ceftriaxona, conforme o fluxograma da Figura 3.

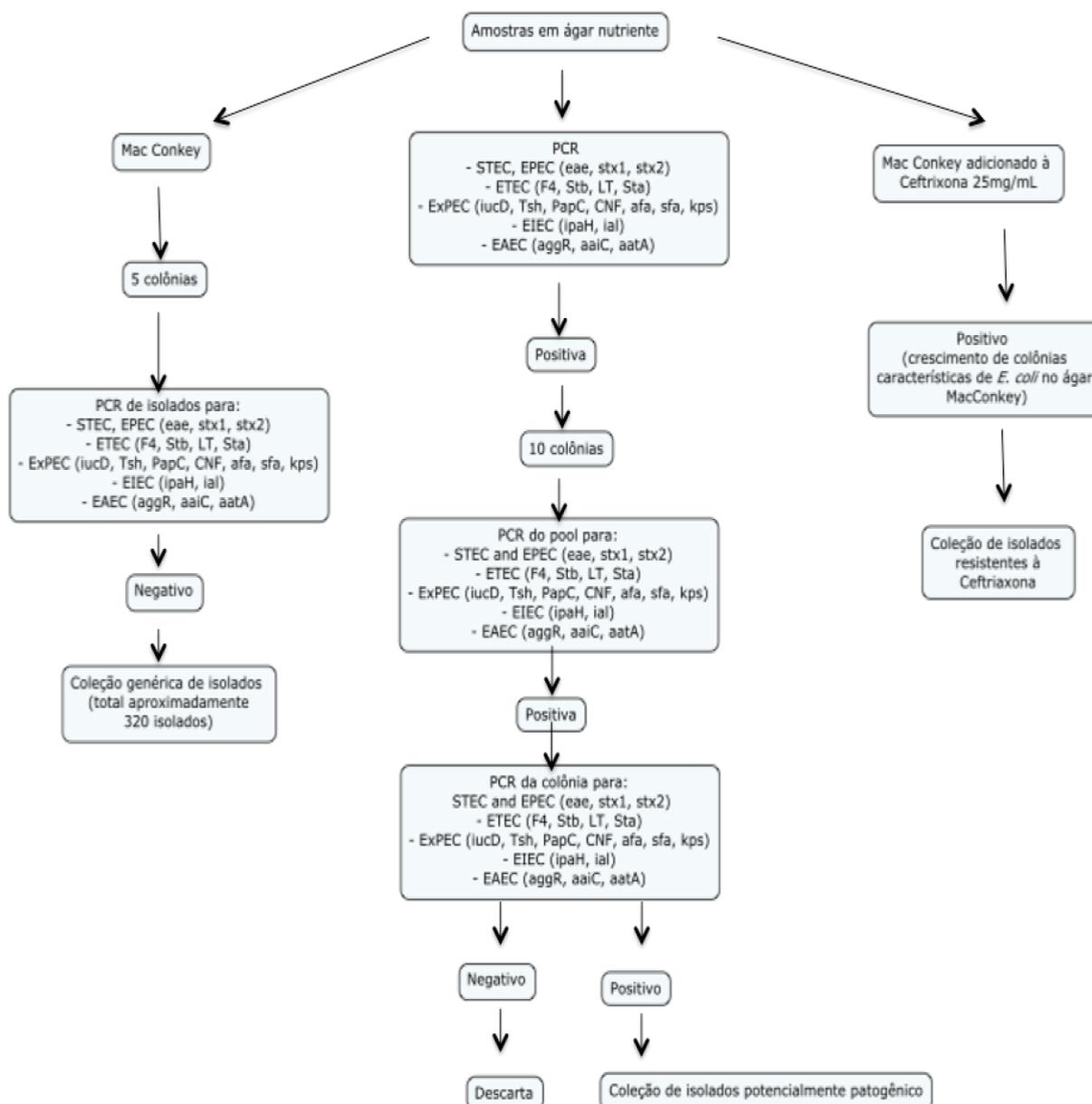


Figura 3. Fluxograma da obtenção das três coleções de *E. coli* a partir das amostras de água, fezes bovinas, leite, queijo, suaves das mãos dos ordenadores, balde ou superfície interna da teteira, dos utensílios utilizados na produção dos queijos, superfícies de elaboração dos queijos, e das mãos do manipulador do queijo de cinco pequenas propriedades leiteiras, produtoras de queijos elaborados a partir de leite cru, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, durante os meses de Janeiro a Março de 2014.

2.3.1. Coleção de isolados de *E. coli* comensais

Para a coleção de isolados de *E. coli* comensais, uma alçada da cultura bacteriana do ágar nutriente foi semeada em placas de Petri contendo ágar MacConkey, as quais foram incubadas a 37°C por 24h. Após a cultura, três colônias de cada amostra foram semeadas e armazenadas no freezer -80°C em solução de glicerol 30%. Nesta coleção não seriam aceitos isolados com genes de virulência, portanto, após a PCR para identificação dos genes, aqueles que porventura os possuíssem seriam eliminados da coleção.

2.3.2 Coleção de isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos

Alíquotas das culturas das amostras foram semeadas em tubos contendo BHI e incubadas *overnight* a 37°C. Após a incubação, a extração de DNA foi realizada pelo método da fervura (KESKIMAKI et al., 2001). A PCR para identificação da presença dos genes STEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e ExPEC para triagem das amostras positivas foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes dos grupos STEC, EPEC, ETEC, ExPEC, EIEC, EAEC, tamanho do fragmento obtido, temperatura de pareamento, amostras controles e referências.

Grupo	Gene	Nome do gene	Sequência	Tamanho (pb)	Temperatura de pareamento (°C)	Controle positivo	Referência
STEC	Stx1	<i>stxA</i>	for 5' TTAGACTTCTCGACTGCAAAG rev 5' TGTTGTACGAAATCCCCTCTG	530	60	EcL 6611	WOODWARD et al.,1992.
	Stx2all Shiga-like toxin typell subunit A and B	<i>stx2A</i>	for 5' TTATATCTGCGCCGGGTCTG rev 5' AGACGAAGATGGTCAAACG	326			
EPEC	EAE (intimin)	<i>eae</i>	for 5' CATTATGGAACGGCAGAGGT rev 5' ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	790	60	EcL2348/69	BEAUDRY et al.,1996.
	bundleforming pili fimbria	<i>bfp</i>	for 5' GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT rev 5' GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300			VIDAL et al., 2004
ETEC	STa	<i>estA</i>	for 5' TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG rev 5' GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163	60	EcL7805	NGELEKA et al.,2003.
	STb	<i>estB</i>	for 5' GCAATAAGGTTGAGGTGAT rev 5' GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368			LORTIE et al.,1991.
	LT	<i>eltB</i>	for 5' TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA rev 5' GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	275			FURRER et al.,1990.
	F4 K88ab1 and K88ab2	<i>faeG</i>	for 5' ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC rev 5' AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA	601			OJENIYI et al.,1994.
ExPEC	CNF-1	<i>cnf</i>	for 5' TCG TTA TAA AAT CAA ACA GTG rev 5' CTT TAC AAT ATT GAC ATG CTG	633	55	EcL1342 1	EWERS et al., 2007.
	P fimbria	<i>papC</i>	for 5' TGA TAT CAC GCA GTC AGT AGC rev 5' CCG GCC ATA TTC ACA TAA C	338			
	Aerobactin	<i>iucD</i>	for 5' AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA rev 5' CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778			EcL 3110

	temperature-sensitive hemagglutinin	<i>tsh</i>	for 5' GGTGGTGCCTGGAGTGG rev 5' AGTCCAGCGTGATAGTGG	620			DOZOIS et al., 2000.
	S fimbriae adhesin	<i>sfa</i>	for 5' CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC rev 5' CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410		18147	JOHNSON et al., 2003
	afimbrial adhesin VIII	<i>afa</i>	for 5'GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC rev 5' CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	594	63	18162	
	protectins group II caps. polysacc. syn.	<i>kpsM II</i>	for 5'GCGCATTGCTGATACTGTTG rev 5' AGGTAGTTCAGACTCACACCT	570	63	O1:K7:H 7	JOHNSON et al., 2003
EIEC		<i>ipaH</i>	for 5' GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C rev 5' GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	620			SETHABUTR et al. (2000)
		<i>ial</i>	for 5'CTG GAT GGT ATG GTG AGG rev 5' GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	320	60	H84-8226	FRANKEL et al., 1990.
EAEC		<i>aaiC</i>	for 5' ATTGTCCTCAGGCATTTTAC rev 5' ACGACAACCCCTGATAAACA	215			BOISEN et al., 2008
		<i>aatA</i>	for 5' CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT rev 5' CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	629	60	17.2	SCHMIDT et al., 1995
		<i>aggR</i>	for 5' CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA rev 5' AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457			

Para tanto, cada reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 2 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de cada primer, 5 µL de DNA genômico e água pura estéril para 25 µL. As reações foram realizadas em multiplex, uma para os genes *stxA*, *stx2A*, *eae*, uma para *bfp*, outra para os genes *estA*, *estB*, *eltB*, *faeG*, outra para os genes *cnf*, *papC*, *iucD*, *tsh*, outra para os genes *sfa*, *afa*, outra para *kpsMIII*, outra para os genes *ipaH*, *ial* e outra para os genes *aaiC*, *aatA*, *aggR*. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 5 min (desnaturação); seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s (desnaturação), temperatura de pareamento específica por 30s e 72°C por 30s (extensão). O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão da Taq DNA polimerase. Uma alíquota desta reação contendo apenas água, sem DNA, foi usada como controle negativo.

As amostras positivas para qualquer um dos genes testados foram semeadas em placas contendo ágar MacConkey, incubadas a 37°C por 24h e, em seguida, dez a quinze colônias características de *E. coli* de cada placa eram semeadas para apenas uma placa de Petri contendo ágar MacConkey (Figura 4). Após a multiplicação bacteriana, tais colônias eram semeadas em um mesmo tubo contendo caldo BHI para possibilitar a multiplicação bacteriana para a extração do DNA por fervura e posterior detecção da presença dos genes de virulência deste *pool*. Caso o *pool* fosse positivo para algum dos genes testados, semeava-se a colônia isolada em BHI para preparação do *DNA template* e posteriormente realizava-se a PCR para a detecção de genes de virulência de isolados. Entretanto, caso não se achasse o isolado positivo no *pool* das 10 primeiras colônias, voltava-se às amostras na placa de MacConkey para a busca de mais 10 ou 15 colônias características, até que se encontrasse(m) o(s) isolado(s) positivo(s).



Figura 4. Placa de MacConkey contendo 10 colônias de *E. coli* separadas, para a produção de um *pool*.

Esta detecção foi feita para a pesquisa de isolados que seriam pertencentes à coleção de potencialmente patogênicos e, também, para a confirmação dos isolados da coleção comensais (nesta última, os isolados deveriam ser negativos a todos os genes de virulência das classes pesquisadas).

2.3.3. Coleção de isolados de *E. coli* resistentes à Ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL) (AGERSØ et al., 2012)

Alíquotas das amostras de *E. coli* em ágar nutriente foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1% com ceftriaxona, os quais foram incubados a 37°C por 30 min. Em seguida, esta cultura foi semeada, com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar MacConkey com ceftriaxona (concentração final da ceftriaxona no MacConkey de 1mg.mL⁻¹). Após a secagem da superfície do meio, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 37°C por

24h. Para tais análises, foi utilizado um controle positivo de *E. coli* resistente à ceftriaxona (CRO-AMR-133.1) e um controle negativo sensível à ceftriaxona (GEN-AMR-127.2). As colônias características de *E. coli* foram selecionadas para a coleção de resistentes à ceftriaxona. Os isolados da coleção de resistentes à ceftriaxona também foram testados por PCR quanto à presença dos genes dos grupos de STEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e ExPEC, e todos foram negativos à detecção dos respectivos genes de virulência.

2.4. Agrupamento filogenético (CLERMONT; DENAMUR, 2013)

A identificação dos genes *chuA*, *YjaA*, *TspE4C2*, *Acek/ArpA1*, *ArpAgpE*, *trpAgpC* e *trpBA* foi realizada para todos os isolados pertencentes às três coleções montadas com os oligonucleotídeos iniciadores segundo proposto por (Tabela 2), seguindo árvore dicotômica (Figura 5).

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para os genes *chuA*, *YjaA*, *TspE4C2*, *Acek/ArpA1*, *ArpAgpE*, *trpAgpC* e *trpBA*, tamanho do produto de amplificação e controle positivo.

Reação de PCR	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Tamanho (pb)	Temperatura de pareamento (°C)	Controle positivo
Quadruplex	<i>chuA</i>	for 5' ATGGTACCGGACGAACCAAC rev 5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	59	ECOR70, EDL933, ECOR31, ECOR60
	<i>yjaA</i>	for 5' CAAACGTGAAGTGTCAGGAG rev 5' AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211		
	<i>TspE4.C2</i>	for 5' CACTATTCGTAAGGTCATCC rev 5' AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152		
	<i>arpAgpE</i>	for 5' AACGCTATTCGCCAGCTTGC rev 5' TCTCCCCATACCGTACGCTA	400		
Grupo E	<i>arpAgpC</i>	for 5' GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC rev 5' GAAAAGAAAAAGAATTCCTCAAGAG	301	59	EDL933, ECOR31
Grupo C	<i>trpAgpC</i>	for 5' AGTTTATGCCCAGTGCGAG rev 5' TCTGCGCCGGTACGCCCC	219	57	ECOR70
Controle interno	<i>trpBA</i>	for 5' CGGCGATAAAGACATCTTCAC rev 5' GCAACGCGGCTGGCGGAAG	489	-	-

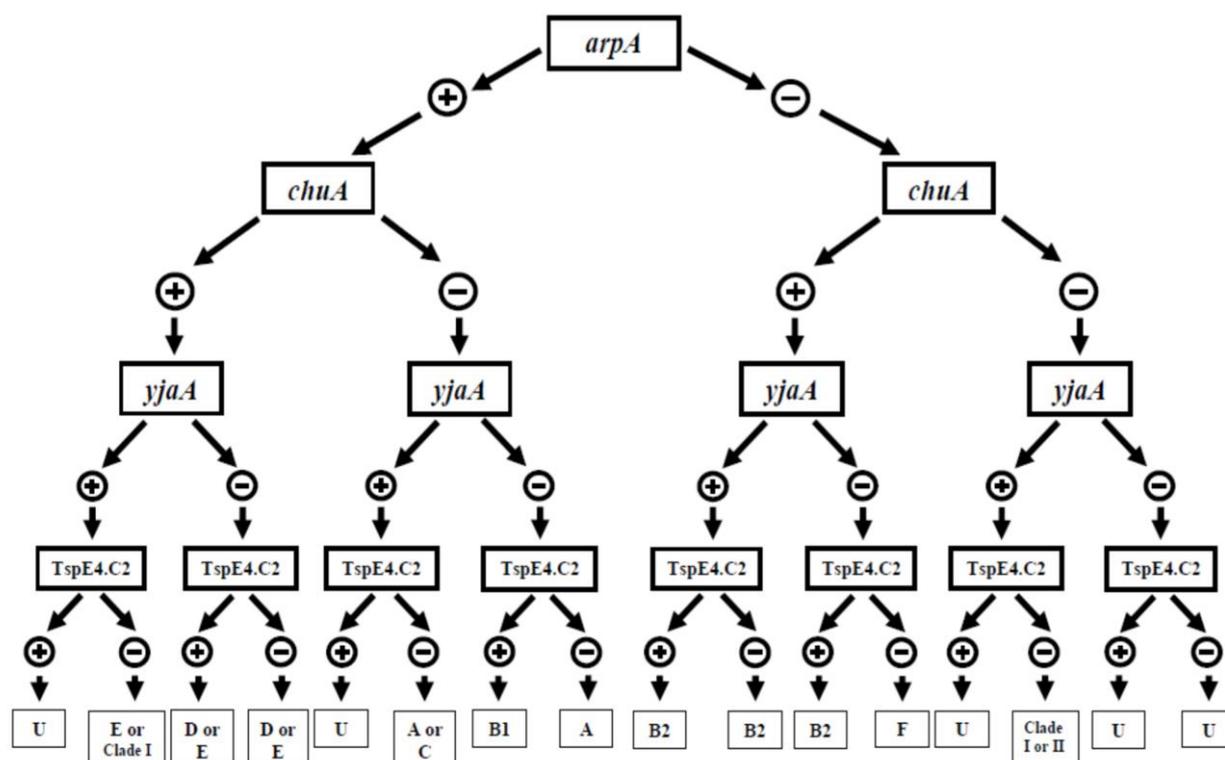


Figura 5. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético das cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR para os genes *chuA*, *YjaA*, *TspE4C2*, *Acek/ArpA1*, *ArpAgpE*, *trpAgpC* e *trpBA*.

Para tanto, cada reação de amplificação foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 2 U de Taq DNA polimerase, 4 pmol de cada primer, 5 µL de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. Primeiramente, realizou-se uma reação com quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores *chuA*, *YjaA*, *TspE4C2*, *Acek/ArpA1*. Dependendo do resultado, seguia-se para a segunda PCR para o grupo C, com os oligonucleotídeos iniciadores *trpAgpC* e *trpBA* e/ou para o grupo E, com os oligonucleotídeos iniciadores *ArpAgpE* e *trpBA*. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de pareamento específica por 30s e 72°C por 30s, e um último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min. Uma alíquota desta reação contendo apenas água, sem DNA, foi usada como controle negativo. Em seguida, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com Safe Imager 2.0 Blue-Light Transilluminator (Invitrogen). Foi usado como

referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

2.5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência

Todos os isolados das três coleções de *E. coli* foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos. Para a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos, os isolados de *E. coli* foram semeadas para placas de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA) e mantidas por 24h a 37°C. Primeiramente, foi mensurada a turbidez de uma amostra da água ultrapura estéril que seria utilizada para as diluições no espectrofotômetro. Em seguida, os isolados presentes na placa de Petri foram transferidos, com auxílio de um suabe estéril, para tubos contendo 10 mL de água ultrapura estéril. A mistura de água e suabe foi agitada no vórtex e sua respectiva turbidez foi mensurada. Tal atividade foi realizada até a obtenção de turbidez 0,5 na escala de MacFarland. A seguir, as culturas foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar *Mueller-Hinton* e, após a secagem da superfície do meio, foram colocados discos contendo os antimicrobianos (BAUER et al., 1966) (Figura 6). Para o teste, foi utilizada uma cepa controle de *E. coli*, ATCC 25922, com halos de inibição conhecidos. As placas foram acondicionadas em estufa a 37°C por 24h.

Os antimicrobianos testados foram: amoxicilina/ácido clavulônico (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), canamicina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), estreptomicina (10 µg), sulfisoxazole (250 µg), tetraciclina (30 µg), trimetropim-sulfametoxazole (23,75 µg) e ceftiofur (30 µg).

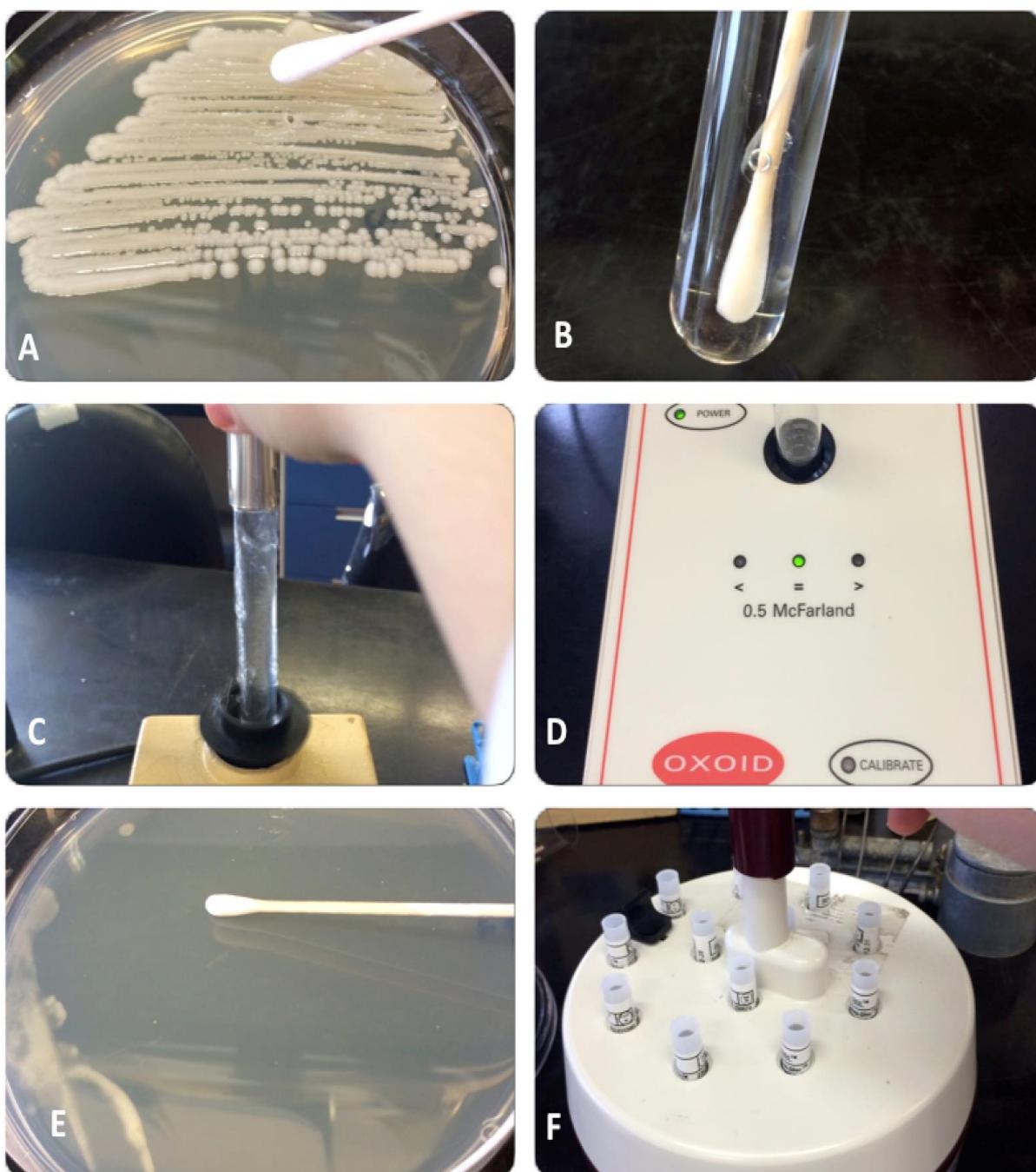


Figura 6. Montagem do teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência A- Cepa de *E. coli* repicada em placa de Petri contendo ágar TSA; B-transferência do isolado com um suabe estéril para 10 mL de água ultrapura estéril; C- vórtex; D- mensuração da turbidez; E- cultura sendo semeada, com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar *Mueller-Hinton*; F-aplicação dos discos contendo os antimicrobianos.

Após o período de incubação, os halos de inibição da multiplicação bacteriana foram mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada. Os halos foram comparados com os intervalos estabelecidos pelo CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE 2007), exceto para o ceftiofur, para o qual foi utilizada outra referência, a CLSI (2008).

2.6. Análise epidemiológica dos isolados de *E. coli* por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Para a análise epidemiológica dos isolados por eletroforese em gel de agarose de campo pulsado (PFGE) foram selecionados 172 isolados das três coleções de *E. coli*, de comensais, potencialmente patogênicos e resistentes à ceftriaxona. Estabeleceu-se que seria um isolado de cada amostra de cada propriedade (por exemplo, uma de água, uma de leite, uma de soro, etc.), sendo uma pertencente a cada grupo filogenético previamente estabelecido, ou seja, se isolados de uma mesma amostra fossem de diferentes grupos filogenéticos, então, os dois seriam selecionados, e também, selecionaram-se os isolados de acordo com o perfil de resistência, priorizando-se aqueles com resistência ao maior número de antimicrobianos. Assim, foram selecionados 134 isolados da coleção de comensais, sendo 26 da propriedade A, 28 da B, 26 da C, 29 da D e 25 da E, 37 isolados da coleção de potencialmente patogênicos das propriedades, e um isolado da coleção de resistentes à ceftriaxona da propriedade C.

A PFGE foi realizada segundo metodologia do The National Molecular Subtyping Network for Food Disease Surveillance (junho 2004), descrita por Ribot et al. (2006), utilizando o equipamento CHEF DR III system a 14°C em TBE 0.5x. A clivagem do DNA foi realizada com 0,2 - 0,8 U XbaI, de acordo com instruções do fabricante. A eletroforese em campo pulsado foi realizada por 18h, de 2,2 a 54s, a 6V. Os perfis de bandas dos géis foram analisados com o auxílio do software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), o qual, ao final das análises, gerou um dendrograma. O padrão de tamanho molecular utilizado foi com a amostra de *Salmonella* sorovar *Braenderup* H9812 Ribot et al. (2006), a qual possui tamanhos de banda conhecidos.

2.7. Análise molecular para identificação de genes de resistência por PCR

Os isolados de *E. coli* selecionados para o PFGE que apresentaram resistência *in vitro* aos antimicrobianos dos grupos de β -lactâmicos (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M}*), do grupo tetraciclina (*tetA*, *tetB* e *tetC*), ao ácido nalidixico e ciprofloxacina (*qnrB*), à estreptomicina (*aadA1*), à trimetoprim-sulfametoxazole e sulfisoxazole (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*) foram examinados quanto à presença dos genes responsáveis por tal resistência por PCR multiplex (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para os genes de resistência a antimicrobianos, tamanho do produto de amplificação, temperatura de pareamento, controle positivo e sua respectiva referência.

Grupo	Oligonucleotídeo iniciadores	Sequência	Tamanho (pb)	Temperatura de pareamento (°C)	Controle positivo	Referência
Estreptomicina	<i>aadA1</i>	for 5' CATCATGAGGGAAGCGGTG rev 5' GACTACCTTGGTGATCTCG	786	50	EcL 3482	
Tetraciclina	<i>tetA</i>	for 5' GTGAAACCCAACATACCCC rev 5' GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888	50	EcL 3482	HAREL et al.,1991
Tetraciclina	<i>tetB</i>	for 5' CCTTATCATGCCAGTCTTGC rev 5' ACTGCCGTTTTTTTCGCC	774	55	EcL 12400	
Tetraciclina	<i>tetC</i>	for 5' ACTTGGAGCCACTATCGAC rev 5'CTACAATCCATGCCAACCC	881	50	PBR 322	MAYNARD et al. 2004
Ceftiofur	<i>bla_{CMY-2}</i>	for 5' TGATGCAGGAGCAGGCTATTCC rev 5' CTAACGTCATCGGGGATCTGC	323			BOYD et al., 2004
Ampicilina	<i>bla_{TEM}</i>	for 5' TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTG rev 5' TACGATACGGGAGGGCTTACC	708		EcL 3482	
Ampicilina	<i>bla_{SHV}</i>	for 5' CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC rev 5' TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	1016	63	PMON38	NUESCH-INDERBINEN et al. 1996
Ampicilina	<i>bla_{OXA}</i>	for 5' CGCAAATGGCACCAGATTCAAC rev 5' TCCTGCACCAGTTTTCCCATACAG	464		EcL 12572	BOYD et al., 2004
Ceftriaxone	<i>bla_{CTX-M}</i>	for 5' ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC rev 5' TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593		CTX-M-15	BOYD et al., 2004

Trimethoprim- sulfametho- xazole	<i>dhfr I</i>	for 5' AAGAATGGAGTTATCGGGAATG rev 5' GGGTAAAACTGGCCTAAAATTG	391	50	EcL 3482	
Trimethoprim- sulfametho- xazole	<i>dhfr V</i>	for 5' CTGCAAAGCGAAAAACGG rev 5' AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG	432	50	EcL 1329	MAYNARD et al. 2003
Trimethoprim- sulfametho- xazole	<i>dhfr VII</i>	for 5' GGTAATGGCCCTGATATCCC rev 5' TGTAGATTTGACCGCCACC	265	50	3B-0	
Quinolona (NAL, CIP)	<i>qnrB</i>	for 5' ACGATGCCTGGTAGTTGTCC rev 5' ACGACATTCGTCAACTGCAA	469	53	298	YUE et al. 2007

Para tal, reações uniplex foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores *aadA*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *dhfr I*, *dhfr V*, *dhfr VII* e *qnrB* e uma reação multiplex para *bla_{CMY-2}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}* e *bla_{CTX-M}*. Cada reação de amplificação (com exceção do PCR multiplex dos genes de resistência a antimicrobianos do grupo de β -lactâmicos) foi conduzida em volumes de 25 μ L contendo: tampão 1X, 2mM de MgCl₂, dNTPs 0,2 mM, 5 μ L de DNA; 12,5 μ M de cada iniciador; 1U de Taq DNA polimerase e água ultrapura (Milli-Q), previamente esterilizada, para completar o volume.

A reação foi realizada em um termociclador a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de pareamento por 30 s e 72°C por 30 s. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 min para completa extensão. Uma alíquota desta reação contendo apenas água Milli-Q estéril, sem DNA, foi usada como controle negativo. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe DNA gel Stain (Invitrogen) e visualizado com Blue-Light Transilluminator. Foi usado como referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

2.8. Sorologia para detecção do antígeno somático (O)

Da coleção de potencialmente patogênicos foram selecionados 18 isolados, dentre os 37, baseado na representatividade genética segundo o PFGE, para a sorologia de detecção do antígeno somático (O).

Para a realização da sorologia e detecção do antígeno somático (O), os isolados foram semeados em placas contendo ágar TSA e mantidas por 24h a 37°C. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de PBS (*phosphate buffer saline*) estéril à placa de Petri contendo TSA e a cultura bacteriana. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma alça estéril, e tal suspensão foi transferida para um tubo vazio, ao qual foi adicionado 1 mL de PBS estéril. Os tubos foram autoclavados a 121°C por 2h.

Após autoclavagem, uma gota da suspensão bacteriana e uma gota de cada pool de antissoro foram colocadas em uma lâmina (ORSKOV et al., 1977). Foram utilizados 17 *pools* de antissoros fornecidos pelo ECL da Universidade de Montreal

(<http://www.ecl-lab.ca/en/products/serotyping.asp>) (Tabela 4). A presença de aglutinação, verificada em aglutinoscópio, foi considerada positiva. Se positivo, testava-se, então os respectivos soros do pool, para que, então, se detectasse o antígeno somático do isolado.

Tabela 4. *Pools* de anti-soros que foram utilizados para detecção do antígeno somático (O)

Pool	Antissoros
1	O8, O9, O20, O26, O64, O101, O141
2	O45, O138, O139, O147, O149, O157
3	O10, O108, O115, O119
1S	O1, O15, O21, O71, O83
2S	O2, O11, O18, O69, O131
3S	O4, O6, O22, O78, O137
4S	O53, O54, O55
5S	O35, O60, O73, O86
6S	O23, O34, O88, O111, O112, O120, O143
7S	O17, O49, O100, O117, O118, O123, O163
8S	O5, O27, O36, O76, O92
9S	O145, O148, O159, O173
10S	O46, O82, O84, O91, O98, O113
11S	O116, O121, O126, O146, O171, O172
HUMANO	O25, O114, O125, 0
COELHO 1	O7, O16, O75, O103
COELHO 2	O109, O128, O132, O153

Fonte: (<http://www.ecl-lab.ca/fr/>)

2.9. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Os 18 isolados selecionados para a sorologia foram submetidos ao sequenciamento do produto de PCR resultante da amplificação dos genes *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, e *recA* (<http://mlst.warwick.ac.uk>), utilizados para compor as análises de MLST (Tabela 5). As reações PCR foram realizadas conforme descrito nos itens acima. Os produtos de PCR foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. O

sequenciamento foi realizado no *Service de Diagnostic – Faculté de Médecine Vétérinaire de L'Université de Montréal*, utilizando-se o kit BigDye® Terminator (ThermoFisherScientific) em um sequenciador ABI PRISM 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 5. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para os genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, e *recA*, tamanho do produto de amplificação e suas respectivas temperaturas de pareamento.

Alvo	Seqüência do iniciador (5' à 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Tm (°C)
<i>adk</i> -F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	54
<i>adk</i> -R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i> -F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	54
<i>fumC</i> -R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i> -F	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	60
<i>gyrB</i> -R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i> -F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	54
<i>icd</i> -R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i> -F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGTCTGGCGG	932	60
<i>mdh</i> -R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purA</i> -F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	54
<i>purA</i> -R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i> -F	CGCATTGCTTTACCCTGACC	780	58
<i>recA</i> -R	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG		

A avaliação da qualidade das sequências, a obtenção das sequências consenso e o corte das extremidades foram realizados com o auxílio dos pacotes de softwares Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998, GREEN, 1996; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As sequências foram cortadas levando-se em consideração a qualidade *phred* mínima de bases igual ou superior a 20. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do banco de dados GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information) utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Em seguida, as sequências foram alinhadas às demais sequências do banco de dados do MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) para a identificação do *sequence type* (ST).

Para as análises filogenéticas, as sequências de cada um dos sete genes e as demais sequências do banco de dados foram alinhadas separadamente pelo software MUSCLE (EDGAR, 2004) utilizando-se posteriormente o software MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). As sequências de *E. coli* O157:H7 utilizadas são referentes ao número de acesso AE005174.2 do GenBank. Como grupos externos foram utilizadas sequências de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* com números de acesso AE014613.1, AL513382.1 e CP000026.1.

Após o alinhamento das sequências, as mesmas foram concatenadas e avaliadas quanto ao modelo evolutivo mais apropriado para as análises segundo o critério de informação de Akaike (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). A árvore filogenética foi gerada pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o tipo de substituição seis, distribuição I+G (Invariable sites; Rate variation among sites) e o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), programado para executar as análises em quatro cadeias simultaneamente, sendo três quentes e uma fria. Foram realizadas quatro corridas independentes com 10.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, cujo desvio padrão desejável é igual ou inferior a 0,01, 25% das árvores geradas foram descartadas como *burn-in*. O filograma gerado pelo MrBayes foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de *E. coli* nos diferentes pontos da obtenção do leite e produção do queijo tipo Minas frescal e análises genotípicas

3.1.1. Coleção de isolados de *E. coli* comensais

A coleção de isolados comensais foi composta por três isolados de cada amostra, sendo 66 da propriedade A, 60 da B, 57 da C, 63 da D e 57 da E, totalizando 303 isolados.

A presença de *E. coli* em todas as amostras pode ser explicada pela falta de higiene observada em todos os pontos de obtenção de leite e produção de queijos,

como por exemplo a não limpeza dos tetos antes da ordenha nas propriedades A, C, D e E ou limpeza incorreta, somente com água, observada na propriedade B. Além disso, a sujidade dos utensílios utilizados foi observada em todas as propriedades, como a presença de resquício de leite de ordenhas anteriores nas peneiras, demonstrando que os utensílios não eram lavados corretamente. Ademais, o leite e os produtos lácteos são uma fonte de inúmeros nutrientes essenciais como proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais (VAN HOOIJDONK; HETTINGA, 2015), sendo estes essenciais tanto para humanos como para microrganismos, facilitando, assim, sua multiplicação.

3.1.2. Coleção de isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos

Das 106 amostras coletadas nas cinco propriedades amostradas, 29 (27,36%) estavam contaminadas com estirpes potencialmente patogênicas (Tabela 6 e Figura 7) e, as demais amostras possuíam apenas isolados comensais. O maior número de amostras nas quais foram identificados genes de virulência de *E. coli* foi encontrado nas propriedades A e C, com 36,36% (8 de 22 amostras) e 42,86% (9 de 21 amostras) de positividade, respectivamente. Estas duas propriedades possuíam currais descobertos e não pavimentados, com maior sujidade de fezes bovinas no momento da ordenha. Além disso, observou-se que nestas propriedades as membranas filtrantes das águas aparentaram-se mais sujas que as demais.

Interessantemente, o grupo mais comumente encontrado na propriedade A foi STEC, e esta foi uma das propriedades mais sujas com relação à presença de fezes bovinas no ambiente de ordenha, que era o mesmo curral de recepção dos animais, lembrando que os bovinos são portadores deste grupo (PADOLA et al., 2004). A propriedade C que captava água de mina e rio, e cuja a água filtrada resultou na membrana filtrante mais suja de todas as propriedades, possui maior número de amostras provenientes do grupo ExPEC. Este grupo além de ser da microbiota intestinal de diferentes animais como aves e até mesmo de animais selvagens, também teve sua presença relatada no ambiente, como água de superfície, água da chuva e águas residuais de efluentes (MANGES; JOHNSON, 2015).

Apenas três das seis classes de *E. coli* diarreiogênicas pesquisadas, STEC,

EPEC e ExPEC, foram identificadas nas amostras. Nota-se que importantes genes de virulência foram detectados em amostras de água, leite, fôrmas e no produto final, o queijo.

Tabela 6. Resultado da triagem de amostras coletadas das cinco propriedades leiteiras, produtoras de queijo elaborados a partir de leite cru, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, dos grupos de *E. coli* STEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC e ExPEC, com os respectivos fatores de virulência encontrados.

Propriedade	Amostra	Grupo	Fator de virulência
A	Água (sala de ordenha)	EPEC	eae
	Leite	STEC, ExPEC	stx2, uicD, PapC
	Fezes bovinas	STEC	stx2, CNF
	Fezes bovinas	STEC	stx2
	Fezes bovinas	STEC	stx2, kps
	Fezes bovinas	STEC	stx2
	Peneira	ExPEC	uicD, kps
	Balde	ExPEC	tsh
B	Água (sala de elaboração de queijo)	Potencialmente ExPEC ^a	kps
	Fezes bovinas	Potencialmente ExPEC	kps
	Superfície interna da teteira	Potencialmente ExPEC	kps
C	Fezes bovinas	STEC, EPEC, ExPEC	stx2, eae, uicD, PapC
	Balde	Potencialmente ExPEC	kps
	Superfície de elaboração do queijo	Potencialmente ExPEC	iucD
	Soro do leite	Potencialmente ExPEC	uicD, kps
	Queijo	Potencialmente ExPEC	kps
	Balde que passou o leite	Potencialmente ExPEC	uicD
	Colher	Potencialmente ExPEC	uicD
	Peneira	Potencialmente ExPEC	uicD
	Fôrmas	STEC	stx1, uicD
D	Água (sala de elaboração de queijo)	STEC	stx2
	Leite	Potencialmente ExPEC	kps
	Fezes bovinas	Potencialmente ExPEC	kps
	Queijo	EPEC	eae
E	Leite	Potencialmente ExPEC	kps
	Fezes bovinas	Potencialmente ExPEC	tsh
	Fezes bovinas	ExPEC	tsh, kps
	Peneira	Potencialmente ExPEC	kps
	Peneira	Potencialmente ExPEC	kps

^a Potencialmente ExPEC, pois segundo Johnson et al., 2003, um isolado para ser ExPEC tem que possuir pelo menos dois genes de virulência deste grupo

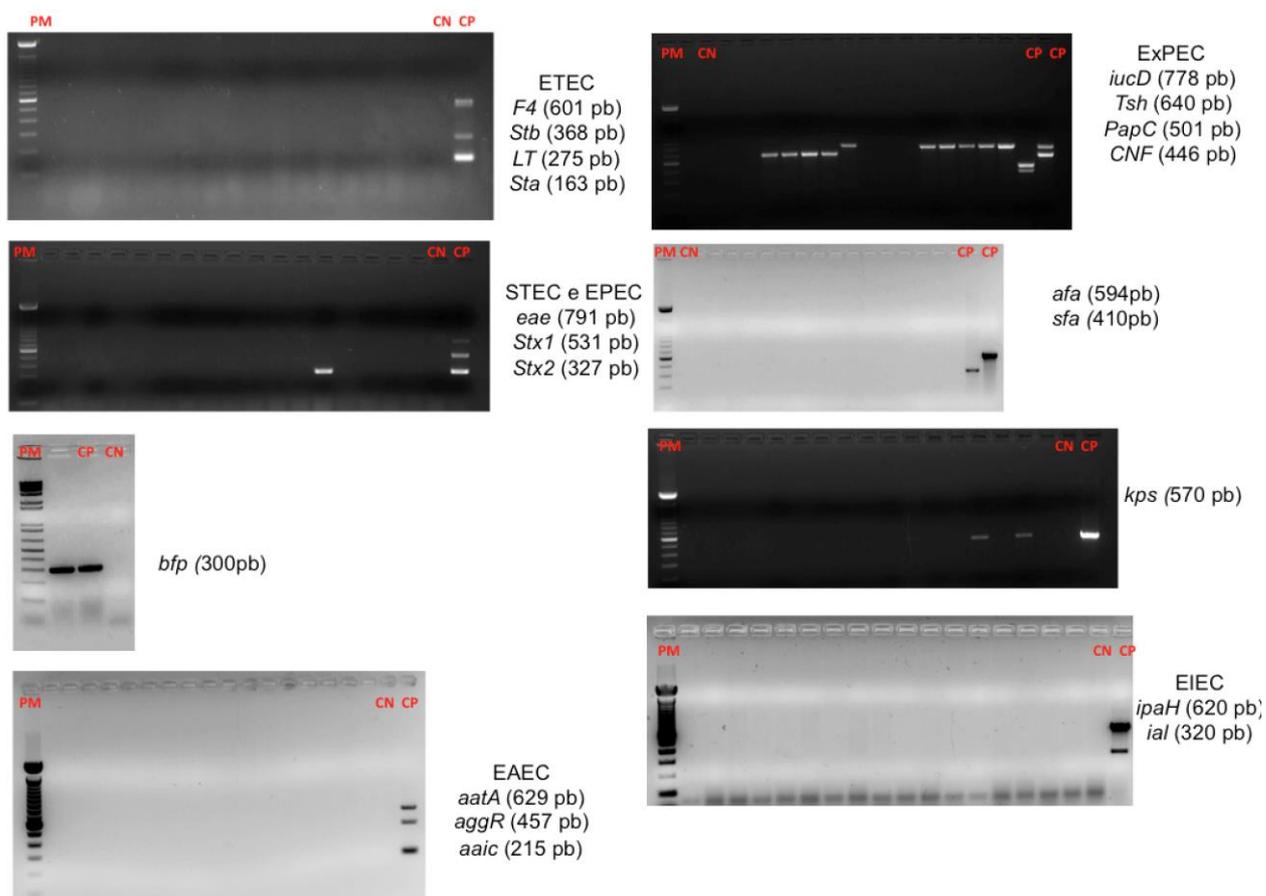


Figura 7. Géis de eletroforese dos produtos de amplificação por PCR para a detecção dos genes de virulência para ETEC, STEC e EPEC, EAEC, ExPEC, EIEC. Saint-Hyacinthe/QC, Canadá, 2015.

Estudos de prevalência de *E. coli* em amostras de leite e queijo também reportaram a presença de estirpes potencialmente patogênicas. Um estudo realizado no Egito, o qual investigou a presença de *E. coli* potencialmente patogênica em 72 amostras de leite cru, 55 de queijo tipo “Karish” e 60 de queijo “Ras”, reportou prevalência de *E. coli* diarreiogênica (DEC) e ExPEC em 36,9% das amostras investigadas. Dos 222 isolados de *E. coli* obtidos, 104 (46,8%) possuíam um ou mais genes de virulência (OMBARAK et al., 2016). Nesta mesma pesquisa, os grupos mais prevalentemente encontrados foram ExPEC, STEC e EPEC, assim como os resultados obtidos no presente estudo. A presença de STEC em amostras de queijos do presente trabalho e nas amostras de leite cru, queijo tipo “Karish” e queijo “Ras” do Egito pode ser explicada pela contaminação fecal de bovinos, os quais são

portadores de *E. coli* deste grupo (PADOLA et al., 2004).

Após a identificação das amostras contaminadas com *E. coli* potencialmente patogênicas, prosseguiu-se o isolamento de tais isolados. Das 29 amostras contaminadas, em apenas seis não foi possível identificar o isolado positivo. Isso se deve ao fato de que as estirpes com genes de virulência podem estar em baixa concentração nas amostras dentre um *pool* de células negativas para a presença de tais genes, o que dificulta o isolamento de uma célula específica quando ocorre a abertura de *pool*. Tal fato ocorreu para uma amostra de água da sala de ordenha e uma de fezes bovinas da propriedade A, que possuía genes de ExPEC; uma de fezes bovinas, uma dos baldes e da colher da propriedade B; e uma de água da sala de elaboração de queijos da propriedade D. Em todas as demais amostras, pelo menos um isolado potencialmente patogênico foi encontrado.

Assim, foram obtidos, no total, 73 isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos, 18 da propriedade A, 18 da B, 29 da C, 5 da D e 3 da E (Tabela 7). A maioria dos isolados são pertencentes ao grupo ExPEC. Tais tipos de isolados têm sido frequentemente encontrado em produtos alimentícios, principalmente de alimentos de origem animal, indicando que tais microrganismos são potenciais patógenos alimentares (SMITH et al., 2007).

Tabela 7. Perfil de genes de virulência dos isolados encontrados nas amostras positivas para genes de virulência das cinco propriedades leiteiras produtoras de queijo cru, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo.

Propriedade	Grupo	Genes de virulência	Amostras (Número de isolados)
A	ExPEC	<i>iucD:papC</i>	Leite (2)
	Potencialmente ExPEC	<i>iucD</i>	Leite (2)
	STEC	<i>stx2</i>	Leite (1), fezes bovinas (2)
	Potencialmente ExPEC	<i>tsh</i>	Balde (11)
B	Potencialmente ExPEC	<i>kps</i>	Água (7), fezes bovinas (1), teteira (10)
	Potencialmente ExPEC	<i>kps</i>	Soro (1)
C	Potencialmente ExPEC	<i>iucD</i>	Superfície de elaboração do queijo (1), soro (5), Balde (17), Peneira (3), Fôrmas (1)
	ExPEC	<i>iucD:kps</i>	Queijo (1)
D	Potencialmente ExPEC	<i>kps</i>	Leite (2), fezes bovinas (2)
	EPEC	<i>eae:bfp</i>	Queijo (1)
E	Potencialmente ExPEC	<i>kps</i>	Leite (1), fezes bovinas (1) e peneira (1)

Em relação aos pontos de coleta na obtenção do leite e produção de queijos tipo Minas frescal, notou-se que, na propriedade A, isolados contendo o gene *stx2* circularam entre amostras de fezes bovinas e leite. Na propriedade B, amostras potencialmente ExPEC, contendo o gene *kps*, circularam entre amostras de fezes bovinas, teteira e água da sala de elaboração de queijos. Apesar desta propriedade possuir poucas amostras contaminadas por isolados potencialmente patogênicos, apenas de água, fezes bovinas e teteira, obteve-se 18 isolados desse tipo, sendo um alto número em comparação com amostras de outras propriedades. Tais isolados potencialmente patogênicos foram obtidos principalmente da teteira, cujo equipamento de ordenha de balde ao pé não foi lavado ao final do uso. Na propriedade C, o gene *iucD* circulou entre as amostras de balde de coleta de leite, peineira, superfície de elaboração de queijo, fôrma e soro de queijo. Já nas propriedades D e E, o gene *kps* circulou entre amostras de fezes bovinas e leite. Assim, essas análises indicaram que cepas potencialmente patogênicas de *E. coli* estavam circulando nos pontos de obtenção do leite e produção do queijo, indicando

a necessidade de maiores cuidados com a higiene.

Cepas potencialmente patogênicas de uma mesma propriedade normalmente possuem o mesmo gene de virulência circulando entre as estirpes bacterianas. Tal fato está relacionado com a transferência horizontal de genes de virulência entre células de *E. coli* (JOHNSON; NOLAN, 2009). Assim, a presença de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas na obtenção do leite e na produção do queijo constitui risco para a saúde pública, pois tais microrganismos podem transferir horizontalmente genes de virulência a estirpes comensais, que também passarão a ser potencialmente patogênicas, aumentando a prevalência de tais estirpes no produto final, o queijo.

3.1.3. Coleção de isolados de *E. coli* resistentes à ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL)

Das 106 amostras avaliadas, apenas uma amostra de fezes bovina, proveniente da propriedade C, mostrou-se resistente à ceftriaxona. Desta amostra foram obtidos cinco isolados com tais características. Este isolado não foi positivo para nenhum dos genes de virulência avaliados. O uso de terceira e quarta geração de cefalosporinas nos animais de produção pode ser uma razão importante para a ocorrência de bactérias resistentes à ceftriaxona entre animais que produzem alimentos como carne e leite (AGERSØ et al., 2012). No caso da propriedade C, o uso indiscriminado e/ou inadequado de antimicrobiano pode justificar a detecção de isolados resistentes à ceftriaxona em amostras de fezes bovinas desta propriedade, fato que foi relatado pelo proprietário que fazia uso do antibiótico até a melhora do animal, não respeitando o tempo adequado. O uso de agentes antimicrobianos nos animais de produção tem resultado no surgimento de microrganismos resistentes e contribuído para a ineficácia desses produtos na prática terapêutica.

A resistência à ceftriaxona é um problema recém-emergente em todo o mundo. Sendo assim, alimentos podem ser um importante veículo para a disseminação de isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos (JOHNSON et al., 2005).

3.2. Agrupamento filogenético

Os 381 isolados de *E. coli* avaliados foram alocados nos grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F e outro desconhecido. Observou-se que, na coleção de isolados comensais, os isolados da propriedade A pertenceram principalmente ao grupo filogenético B1, enquanto os isolados das demais propriedades foram pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1. Com relação à coleção dos isolados potencialmente patogênicos, observou-se que na propriedade A os isolados também foram alocados no grupo filogenético B1, e a maioria dos isolados da propriedade E e C no grupo filogenético A. Na propriedade B foram encontrados isolados pertencentes a quatro grupos filogenéticos, B2, D, E e F, coincidentemente, a única propriedade com ordenha mecânica e a qual não foi observada a lavagem da teteira. Já na propriedade D, foram encontrados isolados pertencentes aos grupos filogenéticos A, B1 e principalmente ao grupo Os isolados resistentes à ceftriaxona, da propriedade C pertenceram exclusivamente ao grupo B1 (Tabela 8).

No atual estudo, os grupos filogenéticos A e B1 foram os mais encontrados, assim como em uma pesquisa realizada com isolados de *E. coli* de água, fezes bovinas, estrume, leite e filtros de leite de uma fazenda leiteira (SON; KESSEL; KARNS, 2009). Os autores relataram que 22% dos isolados pertenciam ao grupo A, 64% ao grupo B1, 4% ao grupo B2 e 11% ao grupo D. Cepas pertencentes ao grupo filogenético B1 foram encontradas em maior quantidade tanto no presente estudo quanto no estudo supracitado, possivelmente devido ao fato de essas estirpes serem capazes de persistir no ambiente por mais tempo (WALK et al., 2007). Cepas do grupo filogenético A são mais comumente encontradas em humanos, bovinos e suínos, enquanto aquelas pertencentes ao grupo B1 são encontradas em bovinos e ovinos, e as pertencentes aos grupos B2 e D são principalmente encontradas em humanos (CARLOS et al., 2010).

Tabela 8. Grupos filogenéticos aos quais pertencem os isolados das três coleções de *E. coli*, isolados comensais, potencialmente patogênicos e resistentes à ceftriaxona, de propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo.

Grupo filogenético	Isolados examinados	Número de isolados (Porcentagem)										
		Coleção isolados comensais					Potencialmente patogênicos					Resistentes à ceftriaxona
		Prop. A	Prop. B	Prop. C	Prop. D	Prop. E	Prop. A	Prop. B	Prop. C	Prop. D	Prop. E	Prop. C
A	119	4 (6,06)	24 (40)	28 (49,12)	25 (39,68)	33 (57,89)	0	1 (5,55)	1 (3,45)	1 (20)	2 (66,66)	0
B1	224	60 (90,91)	31 (51,67)	27 (47,37)	35 (55,56)	22 (38,50)	18 (100)	0	25 (86,21)	1 (20)	0	5 (100)
B2	4	0	2 (3,33)	0	0	0		2 (10,53)	0	0	0	0
C	1	0	0	0	0	1 (1,75)		0	0	0	0	0
D	8	0	0	0	0	0		5(26,32)	0	3 (60)	0	0
E	2	0	1 (1,67)	0	0	1 (1,75)		0	0	0	0	0
F	10	0	0	0	0	0		9 (50,0)	0	0	1 (33,33)	0
Desconhecido	13	2 (3,03)	2 (3,33)	2 (3,51)	3 (4,76)	0		1 (5,55)	3 (10,34)	0	0	0
TOTAL	381	66	60	57	63	57	18	18	29	5	3	5

Da mesma forma como observado anteriormente no item 3.1.2., referente aos genes de virulência de *E. coli*, notou-se que isolados pertencentes ao mesmo grupo filogenético foram encontrados circulando nos diferentes pontos da obtenção do leite e produção do queijo (Tabela 9). Na propriedade A, os isolados encontrados em fezes bovinas, balde e no leite pertenceram exclusivamente ao grupo filogenético B1, embora possuíssem diferentes genes de virulência. Com relação à propriedade B, isolados de teteira e água da sala de elaboração de queijo pertenceram ao grupo filogenético B2. Na propriedade C, isolados do grupo B1 circularam entre amostras de balde, peneira, superfície de elaboração de queijo, fôrmas e soro de queijo. Na propriedade D, em amostras de fezes bovinas e leite foram encontrados isolados do grupo filogenético D. Já na propriedade E, isolados de leite e peneira foram pertencentes ao grupo filogenético A. Estes dados sugerem que, de fato, a contaminação cruzada entre os pontos da obtenção do leite e da produção do queijo está ocorrendo nas cinco propriedades analisadas. Além disso, detectou-se falhas de manejo e higiene durante todos os pontos investigados.

Tabela 9. Relação entre o perfil de virulência e o grupo filogenético dos isolados pertencentes à coleção dos potencialmente patogênicos e as amostras obtidas nas cinco propriedade leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo.

Propriedade	Amostra	Número de isolados	Perfil de virulência	Grupo filogenético
A	Leite	2	<i>iucD:papC</i>	B1
		2	<i>iucD</i>	B1
		1	<i>stx2</i>	B1
	Fezes bovinas	2	<i>stx2</i>	B1
	Balde	11	<i>tsh</i>	B1
B	Água da sala de elaboração de queijos	5		D
		1	<i>kps</i>	B2
		1		U
	Fezes bovinas	1	<i>kps</i>	A
	Teteira	9	<i>kps</i>	F
C	Superfície de elaboração do queijo	1	<i>iucD</i>	B1
		4		B1
	Soro	1	<i>iucD</i>	U
		1	<i>kps</i>	A
	Balde	17	<i>iucD</i>	B1
	Peneira	2		B1
		1	<i>iucD</i>	U
	Forma	1	<i>iucD</i>	B1
	Queijo	1	<i>iucD:kps</i>	U
	D	Leite	2	<i>kps</i>
Fezes bovinas		1		D
		1	<i>kps</i>	A
Queijo	1	<i>eae, bfp</i>	B1	
E	Leite	1	<i>kps</i>	A
	Fezes bovinas	1	<i>kps</i>	F
	Peneira	1	<i>kps</i>	A

A maioria dos isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos pertencentes aos grupos A, B2, D ou F são ExPEC. O mesmo foi relatado ocorrendo em frangos do Estado da Alberta, Canadá (ASLAM et al., 2014), e em um estudo com isolados de *E.*

coli associados à meningite neonatal (NMEC) (JOHNSON et al., 2008). Outro estudo, realizado em um hospital de Londrina, Paraná, com amostras de urina e sangue de pacientes, associou isolados ExPEC ao grupo filogenético B2 e isolados comensais ao grupo A (CYOIA et al., 2015). Ademais, um estudo mostrou que animais saudáveis podem portar isolados de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 e causadores de infecções do trato urinário em humanos (ITU) (JAKOBSEN; HAMMERUM; FRIMODT-MØLLER, 2010). Além disso, isolados pertencentes ao grupo filogenético B2, D e F contêm maior quantidade de genes de virulência do que aqueles pertencentes aos grupos A e B1 (JOHNSON et al., 2001). Tais isolados com maior potencial patogênico foram encontrados nas amostras de água de sala de elaboração de queijo e teteira na propriedade B e em amostras de leite da propriedade D. A presença de tais microrganismos na obtenção do leite e na produção do queijo elaborados a partir de leite cru enfatiza o potencial risco de contaminação do produto final e o consequente risco à saúde pública.

3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência

Isolados de *E. coli* das três coleções montadas apresentaram resistência a uma variedade de antimicrobianos (Tabela 10). Com relação à coleção de isolados comensais, 35,31% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos, sendo os da propriedade B aqueles que apresentaram resistência a um maior número de antimicrobianos, 12 dos 14 testados. Isolados desta coleção, das cinco propriedades amostradas, apresentaram resistência ao antimicrobiano ácido nalidíxico, de grande importância para a saúde pública, seguido da ampicilina, também importante na medicina humana, e tetraciclina, comumente ministrada em rebanhos leiteiros, principalmente para tratamentos de mastites persistentes. O antimicrobiano ácido nalidíxico não é de uso veterinário no Brasil, então, interessantemente, provavelmente o ser humano está sendo fonte de agentes resistentes à este antimicrobiano.

Tabela 10. Percentagem de isolados de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos de importância na medicina humana obtidos de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo.

Origem da <i>E. coli</i>		Percentagem de isolados resistentes por categoria ^a , classe antimicrobiana ^b e antimicrobianos ^c														
		Categoria I					Categoria II						Categoria III			
		FLQ		PEN/I	CPS		PEN		CPM	AMG			FOL		PHE	TET
		NAL	CIP	AMC	TIO	CRO	AMP	FOX	GEN	KAN	STR	SXT	FIS	CHL	TET	
Coleção genérica	Prop. A	66	16,67	0	0	0	0	13,64	0	0	0	7,58	6,06	6,06	1,52	16,67
	Prop. B	60	28,33	0	3,33	1,67	1,67	8,33	6,66	0	3,33	6,66	3,33	8,33	1,67	18,33
	Prop. C	57	22,81	0	1,75	0	0	3,51	5,26	3,51	0	5,26	1,75	5,26	0	8,77
	Prop. D	63	28,57	0	0	1,59	0	11,11	1,59	0	0	3,17	6,35	6,35	6,35	7,94
	Prop. E	57	5,26	1,75	0	0	0	14,04	0	0	0	5,26	5,26	8,77	3,51	3,51
Potencialmente patogênicos	Prop. A	18	11,11	0	0	0	0	22,22	0	0	22,22	27,77	11,11	27,77	0	22,22
	Prop. B	18	77,77	0	55,55	0	0	0	5,55	0	5,55	5,55	0	5,55	11,1	77,77
	Prop. C	29	0	0	0	0	0	93,1	0	0	0	93,1	93,1	93,1	0	17,24
	Prop. D	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prop. E	3	0	0	0	0	0	33,33	0	0	0	33,33	33,33	33,33	0	33,33
Resistentes à Ceftriaxona	Prop. C	5	0	0	100	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0

^a Categoria de antimicrobianos importantes para seres humanos: (I) Muito importantes, (II) Importantes, (III) Importância moderada

^b Classes antimicrobianas: (FLQ) fluoroquinolonas; (PEN/I) penicilina+ inibidores de β -Lactamases; (CPS) cefalosporinas (PEN) penicilina; (CPM) cefamicina; (AMG) aminoglicosídeos; (FOL) folato; (PHE) fenicóis; (TET) tetraciclina.

^cAntimicrobianos: NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; AMC, amoxicilina/ ácido clavulânico; TIO, ceftiofur; CRO, ceftriaxone; AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; STR, streptomycina; SXT, trimethoprim-sulfametoxazole; FIS, sulfisoxazole; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina.

Os isolados da coleção de potencialmente patogênicos apresentaram resistência a pelo menos um de dez antimicrobianos, sendo 69,8% da população resistente. Esta alta resistência, observada principalmente nos isolados potencialmente patogênicos, pode ser justificada pela presença de animais com mastite clínica em todas as propriedades visitadas, e, portanto provavelmente pelo uso indiscriminado e/ou inadequado de antimicrobiano. Notou-se que, na propriedade C, que possuía todos os cinco animais com mastite clínica, 93% dos isolados foram resistentes a ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazole, trimetroprim/sulfametoxazole, enquanto que na B, 77% dos isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e à tetraciclina. Esses dados indicam uma alta prevalência de isolados resistentes a antimicrobianos de importância na terapia humana. E, interessante, a alta resistência ao ácido nalidíxico pode estar vindo através do uso abusivo do ser humano, uma vez que este antimicrobiano é usado apenas na terapia humana, não sendo usado na terapia animal, podendo, então, estar havendo uma transferência de resistência de humano-animal-alimento ou humano-alimento. Ademais, a presença de genes de virulência em *E. coli* está associada à resistência a antimicrobianos (BONYADIAN; MOSHTAGHI; TAHERI, 2014; BADRI et al., 2009). Tal afirmação corrobora o fato de a população de potencialmente patogênicos apresentar maior percentagem de isolados resistentes a antimicrobianos.

Um estudo de 120 isolados de *E. coli* potencialmente patogênicas oriundos de 200 amostras de leite cru e 50 de queijos elaborados a partir de leite cru no Irã mostrou que 100% dos isolados apresentaram resistência à oxitetraciclina, 86% à cefalexina, 56% ao ácido nalidíxico, 42% ao nitrofurantoin, 30% à gentamicina e 28% ao trimethoprim-sulfametoxazole (BONYADIAN; MOSHTAGHI; TAHERI, 2014). Os autores afirmaram que *E. coli* patogênicas e resistentes, encontradas em leite cru e queijo elaborados a partir de leite não pasteurizado, representam um risco a transferência dos fatores de resistência à microbiota do intestino dos consumidores.

Notadamente, os isolados do presente estudo também apresentaram resistência aos antimicrobianos supracitados. Outro estudo que avaliou amostras de 50 queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado no Meio Oeste do Brasil detectou a presença de ETEC resistentes, principalmente aos antimicrobianos cefalotina, com 60% de resistência, ácido

nalidíxico com 40%, doxiciclina com 33%, tetraciclina com 31% e ampicilina com 29% (PANETO et al., 2007). Tais dados corroboram aqueles encontrados na população de isolados da coleção de potencialmente patogênicos do presente estudo.

Ademais, um estudo na Turquia com 146 isolados de *E. coli* provenientes de urina humana detectou resistência a cefalozin, ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazole, amoxicilina, ceftriaxona (ER et al., 2015). Assim, isolados oriundos de urina de humanos apresentaram o mesmo perfil de resistência dos isolados de *E. coli* do presente estudo, tanto das coleções de isolados comensais quanto de potencialmente patogênicos. Tais cepas presentes em diferentes pontos de produção do queijo elaborado a partir do leite cru representam um potencial risco à saúde pública.

Já os isolados da coleção de resistentes à ceftriaxona (ESBL) apresentaram 100% de resistência a amoxicilina, ampicilina, ceftiofur e cefotixin. Um estudo, na Alemanha, que comparou isolados de *E. coli* oriundos de fazendas leiteiras e de fazendas de gado de corte mostrou que o número de isolados ESBL foi maior nas fazendas leiteiras e que estes foram resistentes a ampicilina, cefazolin, cefuroxime, cefalexina, cefotaxime e trimetoprim/sulfametoxazole (SCHMID et al., 2013). Os isolados ESBL do presente estudo apresentaram resistência a antimicrobianos da mesma classe que os do estudo supracitado, corroborando assim com relatos da literatura. Tais classes de antimicrobianos são comumente utilizadas na medicina humana e, portanto, cepas resistentes a tais antimicrobianos presentes na produção do queijo elaborado a partir de leite cru representam um risco à saúde pública.

3.4. Análise epidemiológica dos isolados de *E. coli* por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A análise de PFGE de 172 isolados, das três coleções de *E. coli*, foi realizada a fim de demonstrar a similaridade genética entre os isolados dos diferentes pontos de obtenção do leite e da produção dos queijos (Figura 8). O dendrograma agrupou os isolados em 41 *clusters*, e alguns foram formados de acordo com a procedência dos isolados, mesma

propriedade e/ou mesma amostra, e também de acordo com a similaridade de grupos filogenéticos e presença de mesmos genes de virulência. No entanto, também foi observada similaridade genética entre isolados de diferentes propriedades e amostras (Figuras 9-11).

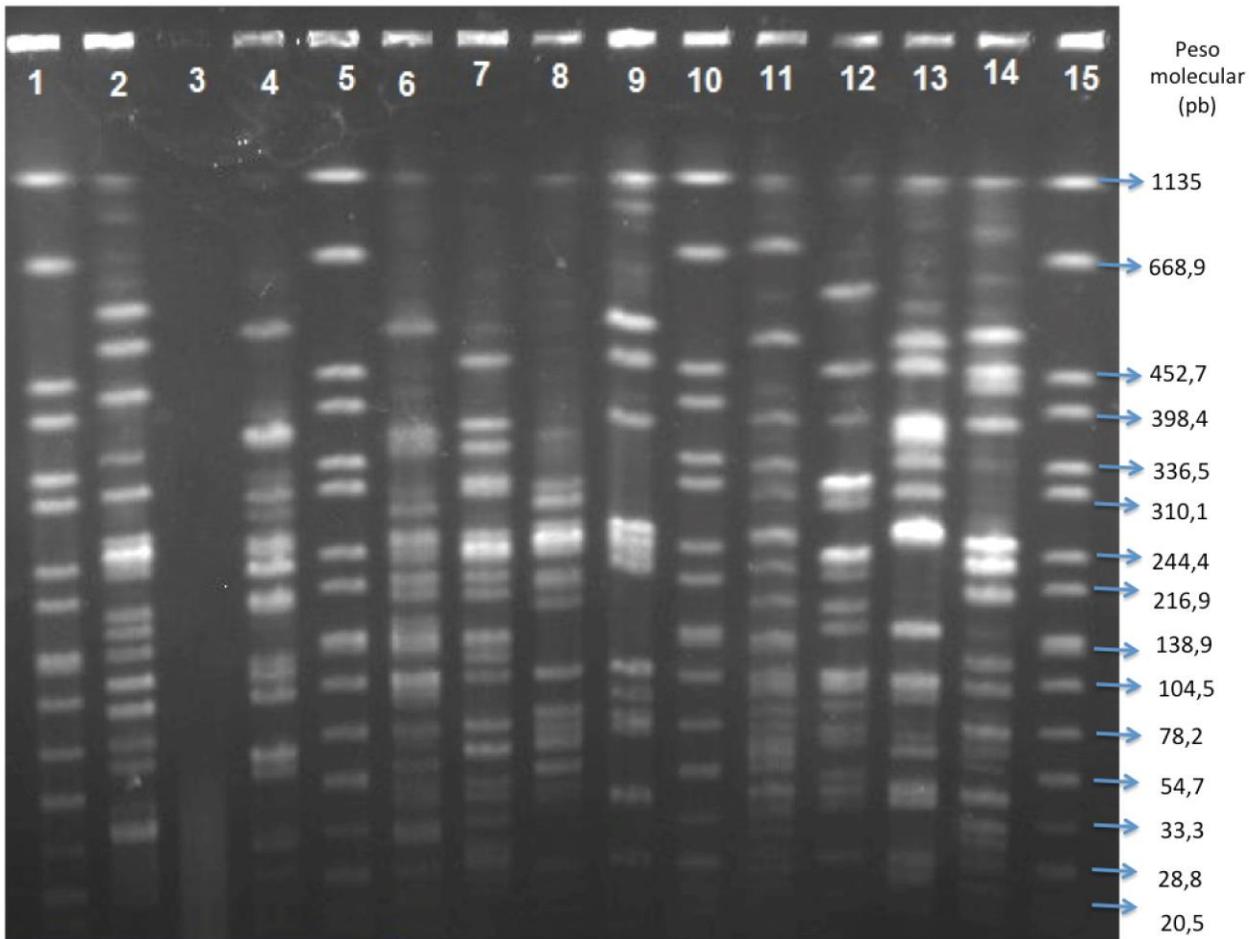


Figura 8. Gel de eletroforese de campo pulsado. Nos poços 1, 5, 10 e 15 observa-se o padrão de DNA de *Salmonella* sorovar Braenderup H9812 digerido com enzima XbaI, com seu respectivo peso molecular. Nos demais poços observa-se isolados de *E. coli* do presente estudo, também digeridos com enzima XbaI.

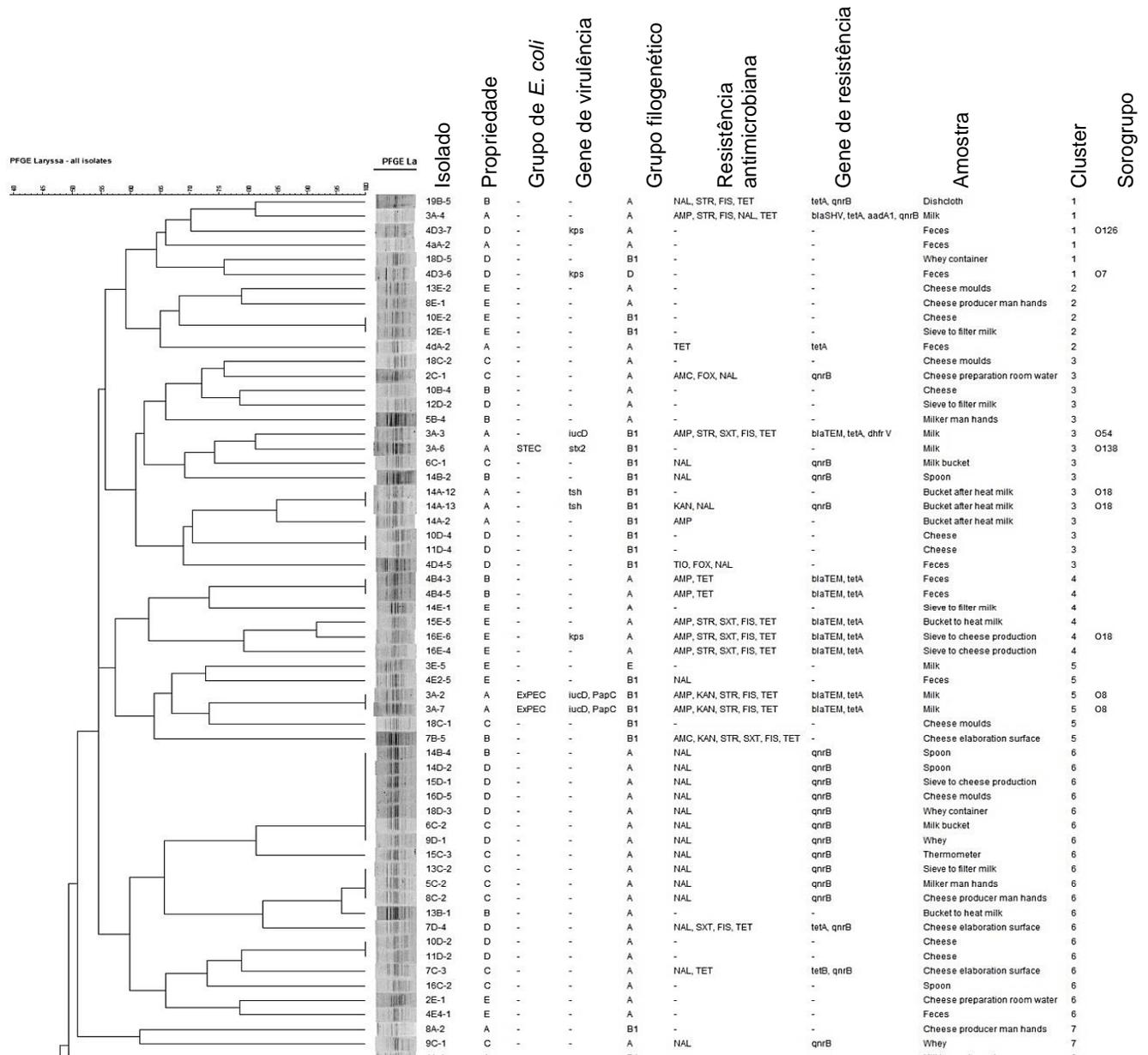


Figura 9. Parte inicial do dendrograma mostrando a relação genética entre os isolados de *E. coli* pela restrição com *Xba*I, oriundos de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo a partir de leite cru, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

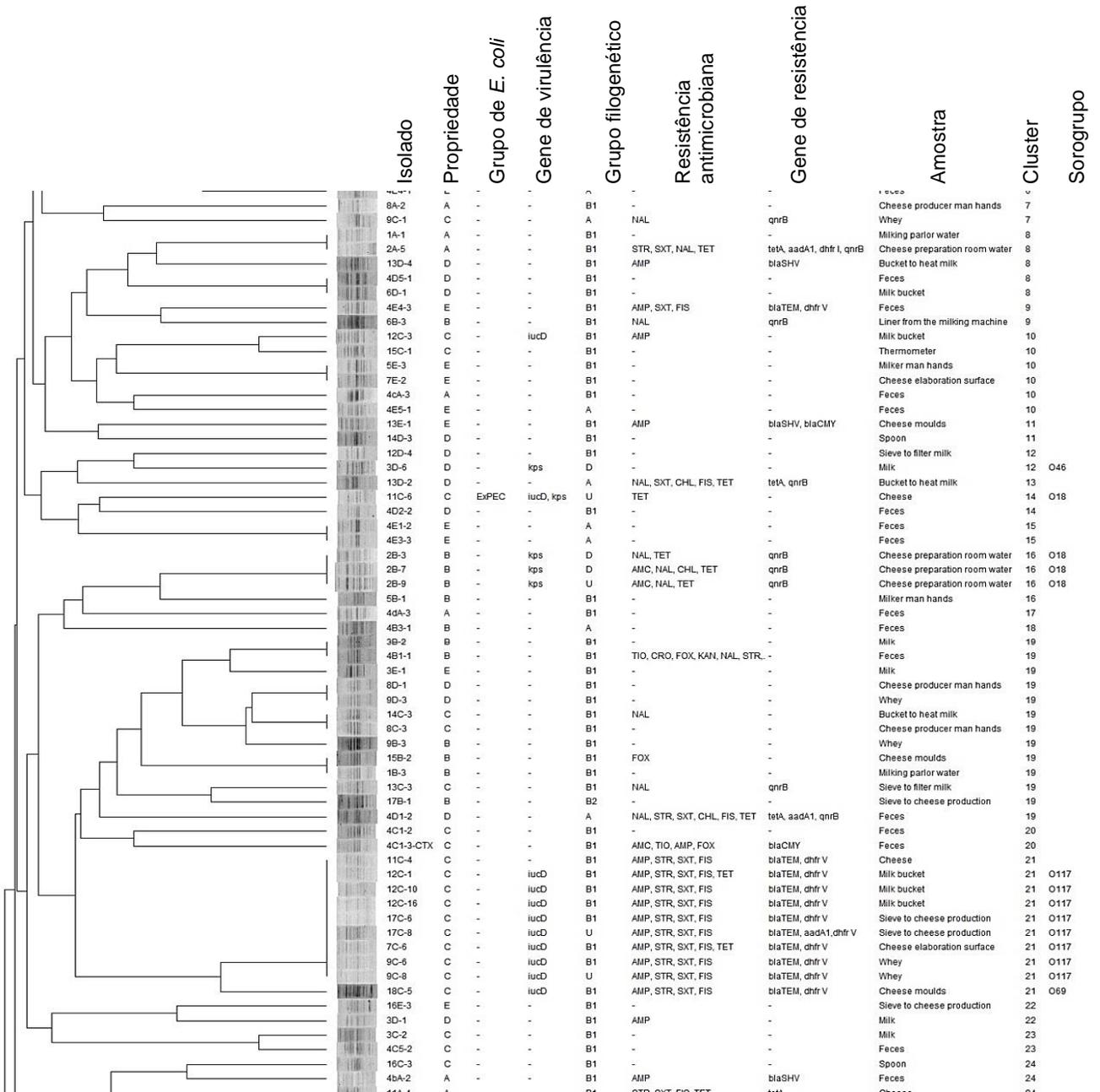


Figura 10. Continuação do dendrograma da Figura 9, mostrando a relação genética entre os isolados de *E. coli* pela restrição com *Xba*I, oriundos de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo a partir de leite cru, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

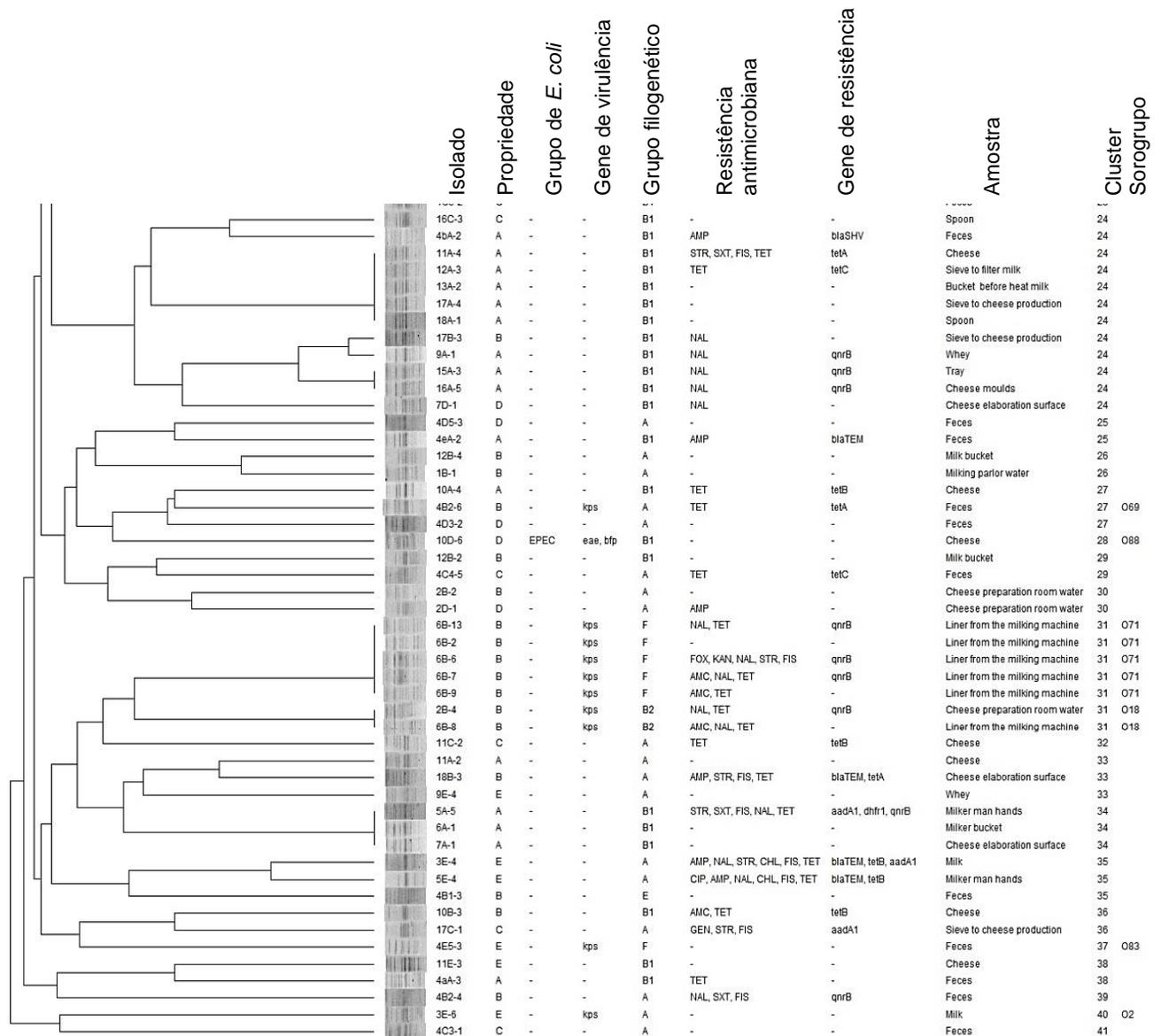


Figura 11. Continuação do dendrograma da Figura 10, mostrando a relação genética entre os isolados de *E. coli* pela restrição com *Xba*I, oriundos de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo a partir de leite cru, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

No dendrograma, observou-se que os isolados da propriedade B, que possuem o gene *kps* e são pertencentes ao grupo filogenético B2, oriundos das amostras de teteiras e da água da sala de elaboração de queijos apresentaram alta similaridade genética. O mesmo ocorreu com isolados da propriedade C, pertencentes ao grupo filogenético B1 oriundos de amostras de balde, peneira, superfície de elaboração do queijo, soro do queijo, fôrmas e queijo. Todos os isolados que apresentaram similaridade genética entre si da propriedade C e grupo B1 apresentaram a presença do gene *iucD*, com exceção do isolado proveniente do queijo; no entanto, todos eles compõem um mesmo *cluster*.

Também, observou-se que isolados da propriedade E, do grupo filogenético A, de amostras de balde e peneira mostraram alta similaridade genética entre si, assim como isolados de amostras de fezes bovinas e água da sala de elaboração de queijos. Tais resultados constituem mais um indicativo da contaminação cruzada de *E. coli*, incluindo as potencialmente patogênicas, entre os diferentes pontos da produção de queijo e leite nas propriedades amostradas. Além disso, isso comprova a necessidade em todas as propriedades de boas práticas de fabricação, de adotar um conjunto de medidas a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios.

Um estudo sobre a importância de STEC na produção leiteira mostrou diferentes rotas de contaminação do leite e derivados, dentre elas contaminação cruzada entre diferentes espécies animais, fezes bovinas, efluentes, alimentação animal, água e contaminação do leite (FARROKH et al., 2013). Além disso, outra pesquisa afirma que, além dessas fontes de contaminações citadas, cresce-se o próprio ambiente, além do manuseio e processamento do alimento por pessoas não treinadas (KOUSTA et al., 2010). De fato, alimentos obtidos por processos caseiros têm grande possibilidade de serem contaminados pelo uso de matérias primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados (DUARTE et al., 2005; LEITE et al., 2005).

Estudos de diversidade genética por PFGE mostrando a similaridade genética entre isolados de *E. coli* oriundos de diferentes amostras, tais como leite cru e queijos dos tipos “Karish” e “Ras”, também foram realizados (OMBARAK et al., 2016). Adicionalmente, assim como observado no presente estudo, a alta variabilidade genética entre isolados de *E. coli* oriundos de água, fezes bovinas, leite e peneira de leite de uma fazenda leiteira também foi

relatada (SON; KESSEL; KARNNS, 2009).

A técnica de PFGE também foi utilizada para verificar a similaridade genética entre isolados de *E. coli* de infecções do trato urinário (ITU) de mulheres, carnes e restaurantes com comidas prontas para comer e mostrou que os isolados de carne de frango e outros alimentos estão relacionados com aqueles isolados de ITU (VINCENT et al., 2010). Da mesma forma, isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos encontrados no leite e no queijo podem estar diretamente relacionados com infecções humanas.

3.5. Identificação de genes de resistência por PCR

A maioria dos isolados resistente aos antimicrobianos *in vitro*, apresentou amplificação de genes associados a tal resistência. Dentre os genes do grupo de β -lactâmicos, *bla_{TEM}* foi o mais comumente encontrado. O gene *aadA1* estava presente nos isolados de todas as propriedades, mas em sua maioria nos isolados da coleção de isolados comensais das propriedades A, C e D. Somente os isolados ExPEC ou potencialmente ExPEC possuíam o gene *bla_{TEM}*, mas não o gene *aadA1* (Tabela 11).

Tabela 11. Números de isolados de *E. coli* (percentagens) com genes de resistência do grupo de β -lactâmicos e estreptomicina (STR) de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, durante os períodos de janeiro a março de 2014.

Coleção	Nº de isolados β -lactamases resistentes	Nº (%) de isolados β -lactamase resistentes possuindo genes β -lactamase					Nº de isolados STR-resistentes	Nº (%) de isolados STR-resistentes possuindo o gene <i>aadA1</i>		
		<i>bla_{CMY}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{SHV}: bla_{CMY}</i>	Nenhum		<i>aadA</i>	Nenhum	
Coleção de isolados comensais	Prop. A	4	0	1 (25)	2 (50)	0	1 (25)	4	3 (75)	1 (25)
	Prop. B	7	0	3 (42,9)	0	0	4 (57,1)	4	1 (25)	3 (75)
	Prop. C	3	0	1 (33,3)	0	0	2 (66,7)	2	1 (50)	1 (50)
	Prop. D	4	0	0	1 (25)	0	3 (75)	1	1 (100)	0
	Prop. E	6	0	5 (83,3)	0	1 (16,7)	0	3	1 (33,3)	2 (66,7)
Potencialmente patogênicos	ExPEC	2	0	2 (100)	0	0	0	2	0	2 (100)
	STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Potencialmente ExPEC	17	0	11 (64,7)	0	0	6 (35,3)	13	0	13 (100)
Resistentes à ceftriaxona	Prop. C	1	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0

Um estudo na Índia mostrou que os oito isolados de *E. coli* de amostras de leite colhidas de animais com mastite apresentavam o gene *bla_{TEM}* (GHATAK et al., 2013). Na Irlanda, um estudo com 100 isolados de *E. coli* de amostras de fezes de bezerros, filtros de leite, galochas, amostras de água, suabe de balde de alimentação, provenientes de 21 fazendas, demonstrou que o gene *aadA1* estava presente em 19% dos isolados (KARCZMARCZYK et al., 2011). Além disso, em 96 isolados de *E. coli* de alimentos foram identificados 2,08% de positividade para o gene *aadA1* e 7,29% para o gene *bla_{TEM}* (RYU et al., 2012).

Tais trabalhos corroboram o presente estudo e são indicativos de que esses genes estão circulando entre isolados provenientes de animais, propriedades rurais e alimentos e que, provavelmente, está ocorrendo transferência horizontal desses genes entre isolados de *E. coli*. Assim, a simples presença de isolados de *E. coli* possuindo esses genes na obtenção do leite e na produção do queijo é um potencial risco à saúde do consumidor.

Com relação aos isolados resistentes à ceftriaxona (ESBL), 100% possuíam o gene *bla_{CMY}*. Um estudo, na Alemanha, comparando isolados de *E. coli* de fazendas leiteiras e fazendas de gado de corte mostrou também a presença deste gene em isolados ESBL, entretanto em baixa percentagem, 2,55% (5 de 196 isolados), e foi o primeiro relato de ESBL nesse País (SCHMID et al., 2013). Isso vem ocorrendo, possivelmente, devido ao uso de terceira e quarta geração de cefalosporinas nos animais de produção (AGERSØ et al., 2012).

Com relação aos genes que codificam resistência à tetraciclina, *tetA* foi o gene mais encontrado, seguido de *tetB* e *tetC*. Os dois últimos não foram encontrados em isolados potencialmente patogênicos (Tabela 12). Um estudo que investigou a prevalência de genes de virulência e resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* de gado de leite (147) e gado de corte (118) na Polônia mostrou que o gene *tetA* estava em 25% dos isolados, e tanto o gene *tetB* quanto a *tetC* encontravam-se em 2,9% dos isolados, apenas oriundos de gado de leite (BOK et al., 2015). Tais resultados podem estar associados à administração constante de antimicrobianos ao gado de leite para tratamento de mastites, o que resulta em seleção de bactérias resistentes (MAZUREK et al., 2013). No presente estudo observou-se maior prevalência dos genes *tetA* com relação aos resultados supracitados.

Um outro estudo com isolados de ExPEC provenientes de animais e humanos demonstrou alta prevalência de tais genes de resistência. Cinquenta e três por cento dos isolados de animais apresentaram o gene *tetA* e 44% o gene *tetB*, enquanto os isolados de humanos mostraram uma prevalência de 44% e 53%, respectivamente (MAYNARD et al., 2004).

O gene *qnrB*, que traduz resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, foi mais encontrado entre os isolados das três coleções, sendo identificado em 100% dos isolados potencialmente ExPEC. Na coleção de isolados comensais, tal gene só não foi encontrado na propriedade E. O gene *qnrB* foi descrito em um estudo com crianças saudáveis no Peru e na Bolívia, e sua prevalência em isolados de *E. coli* foi alta, de 72% (PALLECCHI et al., 2009). Os autores sugeriram que a microbiota comensal poderia ser um importante reservatório desses genes e que a seleção de genes *qnrB* poderia estar relacionada à ligação com outros genes de resistência localizados nos mesmos plasmídeos.

Novamente, tal fato sugere a ocorrência de transferência de genes de resistência entre cepas de *E. coli*, assim como demonstrado em um estudo com isolados dessa espécie bacteriana oriundos de vacas leiteiras e dos habitantes da fazenda. O plasmídeo carregou determinados genes resistentes a diversos antimicrobianos, incluindo tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida (OPPEGAARD et al., 2001).

Com relação aos genes *dhfr*, que conferem resistência a trimetropim-sulfametoxazole e sulfisoxazole, foram encontrados *dhfr I* e *dhfr V*, principalmente, nas propriedades A e C. Não há muitos estudos descrevendo a prevalência desses genes em ambientes hospitalares nem em propriedades rurais. Entretanto, uma pesquisa na República Tcheca com gado e pardais descreveu a presença do gene *dhfr I* em 8 de 57 (14,04%) bezerros (DOLEJSKÁ et al., 2008), percentagem baixa, comparada com a do presente estudo.

3.6. Sorologia para detecção do antígeno somático (O)

Dentre os 18 isolados de *E. coli* da coleção de potencialmente patogênicos analisados, foram encontrados 12 sorogrupos diferentes, sendo o sorogrupo O18 o mais prevalente, com 27,8% de positividade (5 de 18 isolados), encontrado nas propriedades A, B, C e E (Tabela 13). No entanto, observou-se que o sorogrupo O18 encontrava-se presente apenas em isolados EXPEC ou potencialmente ExPEC, de diferentes grupos filogenéticos. Tal sorogrupo foi encontrado em isolados provenientes

de balde, peneira, água da sala de elaboração de queijo, superfície interna da teteira e queijo. Além disso, o sorogrupo O138, encontrado em amostras de leite da propriedade A, e o sorogrupo O126, de amostras de fezes bovinas da propriedade D, encontrados na produção do queijo elaborado a partir de leite cru, são importantes causadores de infecções em humanos.

Tabela 13. Relação de antígenos somáticos (O) encontrados, gene de virulência e grupo filogenético de 18 isolados de *E. coli* de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

Antígeno somático O	uicD	stx2	iucD:Papc	tsh	kps				uicD:kps	eae:bfp
	B1	B1	B1	B1	A	B2	D	F	U	B1
O54	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O138	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
O8	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
O18	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-
O69	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
O71	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
O117	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O46	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
O7	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
O126	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
O88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
O2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
O83	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

Um estudo em Minneapolis, Estados Unidos, com diversos alimentos, encontrou *E. coli* dos sorogrupos O4 e O18, que são muito similares àqueles encontrados em infecções humanas (JOHNSON et al., 2005). Outra pesquisa com isolados de *E. coli* associados à meningite neonatal mostrou que 13,2% desses pertenciam ao sorogrupo O18 (WIJETUNGE et al., 2015). Além de estar associado à meningite, o sorogrupo O18 pode ocasionar infecções urinárias humanas, representando 6% dos isolados clínicos (GIBREEL et al., 2012). Tais estudos demonstram a importância desse sorogrupo na

causa de importantes infecções humanas, sendo, portanto, um risco em potencial à saúde pública, não só por estar na cadeia produtiva de queijos elaborados a partir de leite cru, mas por estar em isolados do próprio queijo.

Ademais, um caso de síndrome hemolítica urêmica associado à *E. coli* produtora de shigatoxina do sorogrupo O138 foi reportado (NGUYEN et al., 2007). Tal sorogrupo também foi encontrado no presente estudo em amostras de leite, o que ressalta o alto risco de contaminação do produto final, o queijo, uma vez que este é elaborado a partir de leite cru. Já o sorogrupo O126, também encontrado no presente trabalho, é comumente encontrado em infecções urinárias, como descrito em um trabalho realizado no Egito (OSMAN et al., 2012).

3.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Com base na análise MLST, os isolados foram classificados em ST (Tabela 14). Em geral, não houve relação do ST com a procedência dos isolados; por exemplo, os isolados 2B-7 e 4D3-6, com ST38, pertencem a diferentes propriedades e são oriundos de diferentes amostras.

Destaca-se a presença do ST131 no presente estudo. Linhagens de ExPEC ST131 foram encontradas em carne de frango e associadas a um caso de ITU humana (VINCENT et al., 2010). Além disso, tal ST foi associada a infecção urinária infantil (CHENG et al., 2015) e infecções generezalizadas na Coreia (CHO et al., 2015). Outra pesquisa recente mostrou infectividade, transmissibilidade e patogenicidade dessa linhagem e a classificou como potencialmente endêmica no mundo, apesar de ainda serem necessários mais estudos para que isso possa ser confirmado (DAUTZENBERG et al., 2016). Também, dados de um trabalho no qual foram analisados os perfis genotípico e fenotípico de isolados de *E. coli* ST131 sugerem que fatores, tais como mecanismos de evolução e resistência a antimicrobianos, provavelmente estão envolvidos na disseminação mundial dessa linhagem (HUSSAIN et al., 2014; NICOLAS-CHANOINE; BERTRAND; MADEC, 2014).

Tabela 14. Classificação da ST dos 18 isolados de *E. coli* oriundos de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, da região de Jaboticabal, e sua procedência, presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos, grupo filogenético, genes de resistência e sorogrupo.

Isolado	ST	Amostra	Propriedade	Grupo	Gene de virulência	Resistência a antimicrobianos	Grupo filogenético	Gene de resistência	Sorogrupo
10D-6	Novo ST	Queijo	D	EPEC	eae, bfp	-	B1	-	O88
11C-6	ST131	Queijo	C	ExPEC	iucD, kps	TET	U	-	O18
12C-10	ST58	Balde	C		iucD	AMP, STR, SXT, FIS	B1	blaTEM, dhfr V	O117
14A-12	Novo ST	Balde	A		tsh	-	B1	-	O18
16E-6	Novo ST	Peneira	E		kps	AMP, STR, SXT, FIS, TET	A	blaTEM, tetA	O18
18C-5	ST5963	Fôrmas de queijo	C		iucD	AMP, STR, SXT, FIS	B1	blaTEM, dhfr V	O69
2B-7	ST38	Água da sala de aboração do queijo	B		kps	AMC, NAL, CHL, TET	D	qnrB	O18
3A-3	Novo ST	Leite	A		iucD	AMP, STR, SXT, FIS, TET	B1	blatem, tetA, dhfrV	O54
3A-6	Novo ST	Leite	A	STEC	stx2	-	B1	-	O138
3A-7	Novo ST	Leite	A	ExPEC	iucD, PapC	AMP, KAN, STR, FIS, TET	B1	blaTEM, tetA	O8
3D-6	ST 349	Leite	D		kps	-	D	-	O46
3E -6	Novo ST	Leite	E		kps	-	A	-	O2
4B2 - 6	Novo ST	Fezes bovinas	B		kps	TET	A	tetA	O69
4D3-6	ST38	Fezes bovinas	D		kps	-	D	-	O7
4D3-7	Novo ST	Fezes bovinas	D		kps	-	A	-	O126
4E5-3	Novo ST	Fezes bovinas	E		kps	-	F	-	O83
6B-6	ST 5164	Superfície interna da teteira	B		kps	FOX, KAN, NAL, STR, FIS	F	qnrB	O71
6B-8	ST 676	Superfície interna da teteira	B		kps	AMC, NAL, TET	B2	-	O18

Pela análise do filograma obtido por análise bayesiana das sequências dos sete genes (Figura 12), observou-se que isolados da mesma propriedade e da mesma amostra, como 3A-3 e 3A-6, todos de leite, da propriedade A, apresentaram alta similaridade genética entre si. Da mesma forma, isolados provenientes de propriedades diferentes também apresentaram similaridade genética como os isolados 16E-6 (de peneira da propriedade E) e 4B2-6 (de fezes bovinas da propriedade B), e os isolados 2B-7 (de água da propriedade B) e 4D3-6 (de fezes bovinas da propriedade D). O agrupamento dos isolados no filograma não foi associado a sua classificação em ST, uma vez que muitos isolados não tiveram seu ST conhecido. No entanto, isolados com diferentes STs, porém oriundos da mesma propriedade, apresentaram alta similaridade genética entre si, como o 12C-10, de balde, e a 18C-5, de fôrmas de queijo, ao passo que isolados de mesma ST e diferentes procedências, como o 2B-7 e o 4D3-6, também agruparam-se no mesmo clado.

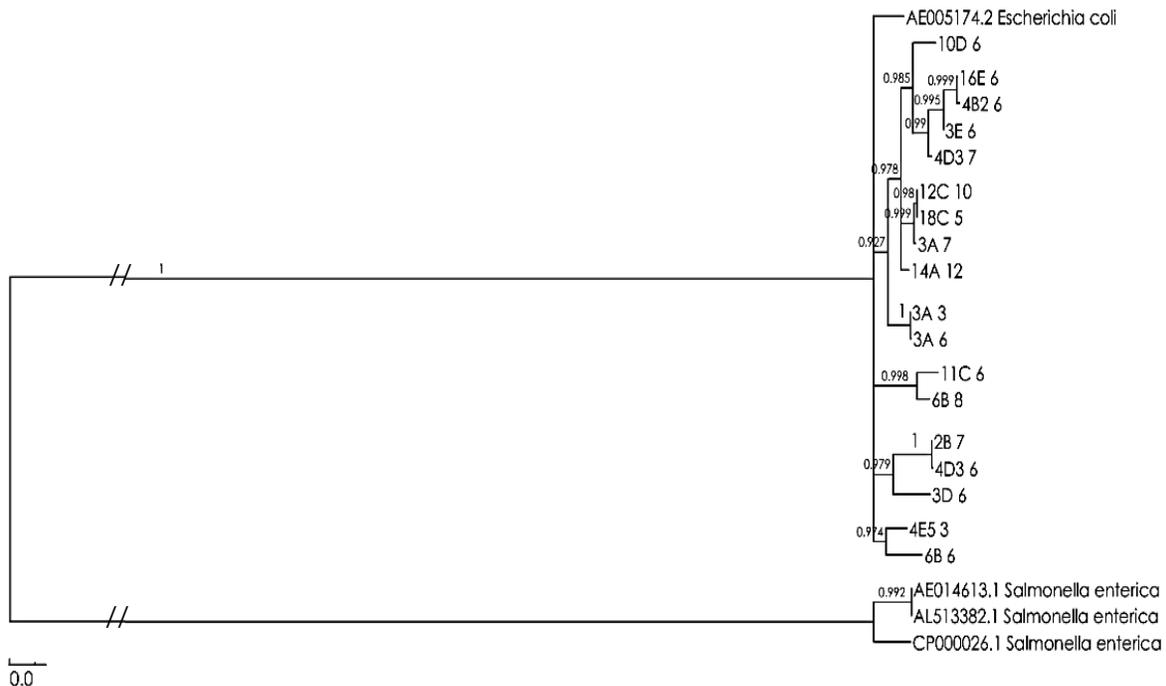


Figura 12. Filograma obtido por análise bayesiana das sequências dos genes *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* de isolados de *E. coli*.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que isolou-se *E. coli* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, detectou-se EPEC, STEC, ExPEC, encontrou-se importantes grupos filogenéticos como B2, D e F, isolados com alta resistência antimicrobiana e com genes de resistência. Ademais, detectou-se importantes sorogrupos e importantes ST's. Demonstrou-se a relação genética e epidemiológica entre os isolados, mostrando que os mesmos estão circulando entre os diferentes pontos de coleta. Conclui-se também que a contaminação de *E. coli* potencialmente patogênicas e com resistência a antimicrobianos no leite e no queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru vem de diferentes fontes de contaminação, o que oferece um potencial risco à saúde pública.

5. REFERÊNCIAS

- AGERSØ, Y., AARESTRUP, F. M., PEDERSEN, K., SEYFARTH, A. M., STRUVE, T., HASMAN, H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. **J Antimicrob Chemother.** 67: 582–588, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research.** Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- APHA – American Public Health Association. Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4^a. ed. Washington: **American Public Health Association**, 2001.
- ASLAM, M., TOUFEER, M., NARVAEZ-BRAVO, C., LAI, V., REMPEL, H., MANGES, A., DIARRA MS. Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. **Int J Food Microbiol.** 177:49-56. 2014.
- BADRI, S., FASSOUANE, A., BOUSLIKHANE, M., FILLIOL, I., HASSAR, M. COHEN, N. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from food in Morocco. **Internet J Food Saf**; 11: 98-101. 2009.

BARBOSA, L.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Incidência de Staphylococcus coagulase positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Revista Higiene Alimentar**. v. 21, n. 148, p. 105 – 109. jan/fev, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v 45, n.4, p.493-496, 1996.

BEAUDRY M, ZHU C, FAIRBROTHER JM, HAREL J. Genotypic and phenotypic characterization of Escherichia coli isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **J Clin Microbiol**;34:144–148. 1996.

BOISEN, N., STRUVE, C., SCHEUTZ, F., KROGFELT, K.A., NATARO, J.P. New adhesin of enteroaggregative Escherichia coli related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun**, 76(7):3281-92. 2008.

BOK, E., MAZUREK, J., STOSIK, M., WOJCIECH, M., BALDY-CHUDZIK, K. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal Escherichia coli derived from dairy and beef cattle. **Int J Environ Res Public Health**. 12(1):970-85. 2015.

BONYADIAN, M. MOSHTAGHI, H., TAHERI, M. A. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero- aggregative Escherichia coli isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. **Veterinary Research Forum**. 5 (1) 29 – 34. 2014.

BOYD, D. A., S. TYLER, S. CHRISTIANSON, A. MCGEER, M. P. MULLER, B. M. WILLEY, E. BRYCE, M. GARDAM, P. NORDMANN, M. R. MULVEY, and CNISP, Health Canada. Complete nucleotide sequence of a 92 kb plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. **Antimicrob. Agents Chemother**. 48:3758-3764. 2004.

BRITO, M. A. V. P. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.39-44, 1998.

CARLOS, C., PIRES, M. M., STOPPE, N. C., HACHICH, E. M., SATO, M. I. Z., GOMES, T. A. T., AMARAL, L. A. OTTOBONI, L. M. M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**, 10:161, 2010.

CHENG, M.F., CHEN W.L., HUNG, W.Y., HUANG, I.F., CHIOU, Y.H., CHEN, Y.S., LEE, S.S., HUNG, C.H., WANG, J.L. Emergence of extended spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli O25b-ST131: a major community-acquired uropathogen in

infants. **Pediatr Infect Dis J.** 34(5):469-75. 2015.

CHO, S.Y., KANG, C.I., CHA, M.K., WI, Y.M., HA, Y.E., CHUNG, D.R., LEE, N.Y., PECK, K.R., SONG, J.H.; Korean Network for Study on Infectious Diseases. Clinical Features and Treatment Outcomes of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. **Microb Drug Resist.** 21(4):463-9. 2015.

CLERMONT, C., DENAMUR, G., The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups, **Environmental Microbiology Reports.** 5(1), 58–65. 2013.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, #45). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals.** 2008.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals.** 2007.

CYOIA, P.S., RODRIGUES, G.R., NISHIO, E.K., MEDEIROS, L.P., KOGA, V.L., PEREIRA, A.P., VESPERO, E.C., HOULE, S., DOZOIS, C.M., NAKAZATO, G., KOBAYASHI, R.K. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **J Infect Dev Ctries.** Oct 29;9(10):1068-75. 2015.

DAUTZENBERG, M.J., HAVERKATE, M.R., BONTEN, M.J., Bootsma, M.C. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open.** 6(3):e009971. 2016.

DOLEJSKÁ, M., SENK, D., CÍZEK, A., RYBARÍKOVÁ, J., SYCHRA, O., LITERÁK, I. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. **Res Vet Sci.** 85(3):491-4. 2008.

DOZOIS CM, DHO-MOULIN M, BREE A, FAIRBROTHER JM, DESAUTELS C, CURTISS R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infect Immun;** 68:4145–4154. 2000.

DUARTE, D. A., SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2005.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and highthroughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

ER, D. K., DUNDAR, D., UZUNER, H., OSMANI, A. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis** 89 188e194. 2015.

EWERS C, LI G, WILKING H, KIESSLING S, ALT K, ANTA´O EM, LA- TURNUS C, DIEHL I, GLODDE S, HOMEIER T, BO´HNKE U, STEINRU´CK, , PHILIPP HC, WIELER LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **Int J Med Microbiol**;297:163–176. 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**. Plainview, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

FARROKH, C., JORDAN, K., AUVRAY, F., GLASS, K., OPPEGAARD, H., RAYNAUD, S., THEVENOT, D., CONDRON, R., DE REU, K., GOVARIS, A., HEGGUM, K., HEYNDRIKX, M., HUMMERJOHANN, J., LINDSAY, D., MISZCZYCHA, S., MOUSSIEGT, S., VERSTRAETE, K., CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **Int J Food Microbiol**. 15;162(2):190-212. 2013.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F., NASSU, R. T., AZEVEDO, E. H. I. de., MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23. suppl., p. 162-165, 2003.

FOXMAN, B.; RILEY, L. W. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**., v. 153, p. 1135-1141, 2001.

FRANKEL, G., RILEY, L., GIRON, J.A., VALMASSOI, J., FRIEDMANN, A., STROCKBINE, N., FALKOW, S., SCHOOLNIK, G.K. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. **J Infect Dis**. 161(6):1252-6. 1990.

FURRER B, CANDRIAN U, LUTHY J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Lett Appl Microbiol**;10:31–34. 1990.

GHATAK, S., SINGHA, A., SEN, A., GUHA, C., AHUJA, A., BHATTACHARJEE, U., DAS, S., PRADHAN, N.R., PURO, K., JANA, C., DEY, T.K., PRASHANTKUMAR, K.L., DAS, A., SHAKUNTALA, I., BISWAS, U., JANA, P.S. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitic milk samples. **Transbound Emerg Dis**. 60(5):385-9. 2013

GIBREEL, T.M., DODGSON, A.R., CHEESBROUGH, J., FOX, A.J., BOLTON, F.J., UPTON, M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **J Antimicrob Chemother** 67:346–356. 2012.

GILL, A., MARTINEZ-PEREZ, A. McILWHAM, S., BLAIS, B. Development of a method for the detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in food. **Journal of Food Protection**. v. 75, n. 5, p. 827-837. 2012.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. CONSED: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. Plainview, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GREEN, P. PHRAP **documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 10 agosto de 2016.

HAREL J, LAPOINTE H, FALLARA A, LORTIE LA, BIGRAS-POULIN M, LARIVIERE S, FAIRBROTHER JM. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. **J Clin Microbiol**;29:745–752. 1991.

HERRERO M, LORENZO V, NEILANDS JB. Nucleotide sequence of the iucD gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions. **J Bacteriol** 1988;170:56–64.

HUSSAIN, A., RANJAN, A., NANDANWAR, N., BABBAR, A., JADHAV, S., AHMED, N. Genotypic and phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolates belonging to clinical sequence type 131 (ST131), clinical non-ST131, and fecal non-ST131 lineages from India. **Antimicrob Agents Chemother**. 58(12):7240-9. 2014.

JAKOBSEN, L. HAMMERUM, A. M., FRIMODT-MØLLER, N. Virulence of *Escherichia coli* B2 Isolates from Meat and Animals in a Murine Model of Ascending Urinary Tract Infection (UTI): Evidence that UTI Is a Zoonosis. **Journal Of Clinical Microbiology**, Vol. 48, No. 8 p. 2978–2980, 2010.

JOHNSON, J.R., DELAVARI, P., KUSKOWSKI, M., STELL, A.L.: Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, 183:78-88. 2001.

JOHNSON, J. R., KUSKOWSKI M. A., OWENS, K., GAJEWSKI, A., WINOKUR, P. L. Phylogenetic Origin and Virulence Genotype in Relation to Resistance to Fluoroquinolones and/or Extended-Spectrum Cephalosporins and Cephamycins among *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans. **The Journal of Infectious Diseases**.;188:759–68. 2003.

JOHNSON J.R., KUSKOWSKI M.A., SMITH K., O'BRYAN, T. T. TATINI, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **J Infect Dis**, 191: 1040–9. 2005;

JOHNSON, T. J., NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 73, 750–774. doi: 10.1128/ MMBR.00015-09. (2009).

JOHNSON, T.J., WANNEMUEHLER, Y., JOHNSON, S.J., STELL, A.L., DOETKOTT, C., JOHNSON, J.R., KIM, K.S., SPANJAARD, L., NOLAN, L.K., Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 7043–7050. 2008.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**; 2:123–140. 2004.

KARCZMARCZYK, M., WALSH, C., SLOWEY, R., LEONARD, N., FANNING, S. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. **Appl Environ Microbiol.** 77(20):7121-7. 2011.

KESKIMAKI, M., EKLUND. M., PERSONEN, H., HEISKANEN, T., SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 40, 151-156. 2001.

KOUSTA, M., MATARAGAS, M., SKANDAMIS, P., DROSINOS, E. H., Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at the farm and processing levels. **Food Control.** v. 21, p. 805- 815. 2010.

LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 89-93, jun. 2005.

LORTIE LA, DUBREUIL JD, HAREL J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **J Clin Microbiol**;29: 656–659. 1991.

MANGES AR, JOHNSON JR. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectrum** 3(5):UTI-0006- 2012. 2015.

MAYNARD, C., FRANC, S. B., SANSCHAGRIN, O., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIE`RE, S., HAREL, J. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5444–5452, 2004.

MAYNARD, A. D., BARON, P.A., SHVEDOVA, A.A., KISIN, E.R., AND CATRANVA, V. .

Exposure to carbon nanotube material 1: Aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotube material. **Toxicology and Environmental Health.**, 2003.

MAZUREK, J.; PUSZ, P.; BOK, E.; STOSIK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. The phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance in *Escherichia coli* populations isolated from farm animals with different exposure to antimicrobial agents. **Pol. J. Microbiol.** 62, 173–179. 2013.

NGELEKA M, PRITCHARD J, APPELYARD G, MIDDLETON D, FAIRBROTHER JM. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **J Vet Diagn Invest**;5:242–252. 2003.

NGUYEN, Q.V., HOCHSTRASSER, L., CHUARD, C., HÄCHLER, H., REGAMEY, C., DESCOMBES, E. Adult hemolytic-uremic syndrome associated with urosepsis due to Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O138:H-. **Ren Fail.** 29(6):747-50. 2007;

NICOLAS-CHANOINE, M.H., BERTRAND, X., MADEC, J.Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clin Microbiol Rev.** 27(3):543-74. 2014.

NUESCH-INDERBINEN MT, HACHLER H, KAYSER FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV b-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with Etest. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 15:398–402. 1996.

OJENIYI B, AHRENS P, MEYLING A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **J Vet Med**;41:49–59. 1994.

OMBARAK, R.A., HINENOYA, A., AWASTSHI, S.P., IGUCHI, .A. SHIMA, A., ELBAGORY, A.R.M., YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Int. J. Food Microbiol.** 221, 69-76. (2016).

OPPEGAARD, H., STEINUM, T. M., WASTESON, Y.. Horizontal Transfer of a Multi- Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Environment. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, 2001.

ORSKOV, I., ORSKOV , F., JANN, B., KLAUS, J. Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 3, p. 667-710, 1977.

OSMAN, K.M., MUSTAFA, A.M., ELHARIRI, M., ABDELHAMED, G.S. Identification of serotypes and virulence markers of *Escherichia coli* isolated from human stool and urine samples in Egypt. **Indian J Med Microbiol.**;30(3):308-13. 2012.

PADOLA, N.L., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., BLANCO, M., BLANCO J., ETCHEVERRIA, A.I., Arroyo, G. H., Usera, M. A., Parma, A. E. Serotypes and virulence

genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. **Vet Microbiol** 100:3-9; 2004;

PALLECCHI, L., RICCOBONO, E., MANTELLA, A., BARTALESI, F., SENNATI, S., GAMBOA, H., GOTUZZO, E., BARTOLONI, A., ROSSOLINI, G.M. High prevalence of qnr genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. **Antimicrob Agents Chemother**. 53(6):2632-5. 2009

PANETO, B. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M.; Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RYU, S.H., LEE, J.H., PARK, S.H., SONG, M.O., PARK, S.H., JUNG, H.W., PARK, G.Y., CHOI, S.M., KIM, M.S., CHAE, Y.Z., PARK, S.G., LEE, Y.K. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **Int J Food Microbiol**. 159(3):263-6. 2012.

SCHMID, A., HÖRMANSDORFER, S., MESSELHÄUSSER, U., KÄSBOHRER, A. SAUTER-LOUIS, C., MANSFELD, R., Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms. **Applied and Environmental Microbiology** p. 3027–3032. Vol 79 Number 9. 2013.

SCHMIDT, H., KNOP, C., FRANKE, S., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J., KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**. 33(3):701-5. 1995.

SETHABUTR, O., VENKATESAN, M., YAM, S., PANG, L.W., SMOAK, B.L., SANG, W.K., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., ISENBARGER, D.W. Detection of PCR products of the ipaH gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 37(1):11-6. 2000.

SMITH, J. L. FRATAMICO, P.M., GUNTHER, N.W. Extraintestinal Pathogenic

Escherichia coli. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 2, n. 4, p. 134-163, 2007.

SON, I., KESSEL, J. A. S. V., KARNS, J. S. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in a Dairy Farm. **Foodborne Pathogens And Disease** Volume 6, Number 7, 2009.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, p. 7, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAN HOOIJDONK T., HETTINGA K.. Dairy in a sustainable diet: a question of balance. **Nutr. Rev.**, 73 Suppl 1: 48–54. (2015).

VICENTE, H. I. G.; **Epidemiologia molecular de cepas de *Escherichia coli* O157, O111 e O113 produtoras de shigatoxina, isoladas de diferentes tipos de amostras de propriedades leiteiras.** Jaboticabal, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

VIDAL, R., VIDAL, M., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V., 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 42, 1787-1789.

VINCENT, C., BOERLIN, P., DAIGNAULT, D., DOZOIS, C. M., DUTIL, L., GALANAKIS, C., REID-SMITH, R. J., TELLIER, P. P., TELLIS, P. A., ZIEBELL, K., MANGES, A. R. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 88-95, 2010.

WALK, S.T., ALM, E.W., CALHOUN, L.M., MLADONICKY, J.M., WHITTAM, T.S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environ Microbiol**, 9:2274-2288. 2007.

WIJETUNGE, D.S., GONGATI, S., DEBROY, C., KIM, K.S., COURAUD, P.O., ROMERO, I.A., WEKSLER, B., KARIYAWASAM, S. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). **BMC Microbiol.** 15:211. 2015.

WOODWARD MJ, CARROLL PJ, WRAY C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Vet Microbiol**;31:251–261. 1992.

YUE, L., JIANG, H.X., LIAO, X.P., LIU, J.H., LI, S.J., CHEN, X.Y., CHEN, C.X., LÜ, D.H., LIU, Y.H. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. **Vet Microbiol.** 10;132(3-4):414-20. 2008.

CAPÍTULO 3 – Gram-positivos de importância em saúde pública em diferentes pontos da obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado

RESUMO – No Brasil há tradição de consumo de queijo tipo Minas frescal. No entanto, tal alimento tem grande possibilidade de ser contaminado devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados. Além disso, a falta de informação e de treinamento das pessoas que manipulam tais alimentos pode acarretar em contaminação por diversos microrganismos, comprometendo a qualidade e a segurança da saúde do consumidor. Falha em qualquer fase do processo poderá resultar em contaminação do alimento, que, mesmo apresentando aparência, gosto, consistência e aroma normais, pode veicular diversos microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Desta forma, este estudo objetivou isolar *Listeria spp.* e identificar as espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, além de detectar genes de virulência destes e isolar *Staphylococcus aureus* na obtenção do leite e na elaboração de queijos tipo Minas frescal e detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas. Para tanto, foram realizadas coletas em cinco pequenas propriedades rurais produtoras deste tipo de queijo na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo. Foram coletadas amostras de suabes de fezes bovinas, amostras de mãos de ordenhador, balde de ordenha, leite, água, superfície de elaboração de queijos, mãos de manipulador do queijo, peneiras, bandejas, fôrmas e escumadeiras. O gênero *Listeria spp.* teve uma alta prevalência nas amostras, como por exemplo na propriedade E, que detectou o gênero *Listeria spp.* em 100% das amostras, incluindo água, leite e queijo. Entretanto, nenhuma das espécies pesquisadas foi identificada. *S. aureus* foi encontrado em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos, principalmente em amostras de queijo, em todas propriedades. Ademais, diferentes genes codificadores de enterotoxinas foram detectados em tais isolados, como *eta*, *seg*, *sei* e *hlg*. Assim, conclui-se que isolou-se *Listeria spp.* de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, entretanto não se detectou as espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*. Isolou-se *S. aureus* e detectou-se importantes genes codificadores de enterotoxinas em diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal. Conclui-se também que a elaboração de queijos a partir de leite cru refrigerado realizada sob má condições higiênicas e sanitárias podem contaminar o produto final, o queijo, com bactérias Gram-positivas de importância em saúde pública.

Palavras-chaves: *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, genes de enterotoxinas, saúde pública

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de queijos foi introduzida pelos imigrantes portugueses, no período colonial, com o queijo tipo “Serra da Estrela”, e posteriormente sofreu adaptações devido às condições ambientais de cada região, criando-se o queijo fresco (BORELLI et al., 2006; LIMA et al., 2009). Este é um dos principais derivados do leite no país e é, em sua maioria, produzido por pequenos produtores, por pessoas não treinadas (SALOTTI et al., 2006).

Os alimentos obtidos por processos caseiros têm grande possibilidade de serem contaminados pelo uso de matérias-primas de fontes de má qualidade, utensílios mal higienizados ou contaminados (DUARTE et al., 2005; LEITE et al., 2005). Além disso, a falta de informação e de treinamento das pessoas que fabricam e manuseiam tais alimentos pode acarretar em contaminação por diversos microrganismos, comprometendo a qualidade e a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação do produto. Ademais, o queijo não maturado é um produto perecível e deve ser consumido rapidamente, após curta estocagem e em ambiente refrigerado (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; FEITOSA et al., 2003; SALOTTI et al., 2006; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006), caso contrário pode não ser seguro para o consumidor.

Assim, tratando-se de segurança e qualidade de queijos, é importante que o controle de qualidade comece desde a obtenção do leite e envolva todas as etapas de produção, até o produto final. Falha em qualquer fase do processo poderá resultar em contaminação do alimento, que, mesmo apresentando aparência, gosto, consistência e aroma normais, pode veicular diversos microrganismos patogênicos. Dependendo do microrganismo, os primeiros sintomas são evidenciados nas primeiras 36h após o consumo do alimento contaminado (OKURA, 2005). Em países industrializados, o leite e os produtos lácteos estão envolvidos em 2 a 6% de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) relacionados à ingestão de alimentos (CLAEYS et al., 2013).

São importantes causas de DTAs os contaminantes de origem exógena, incluídos os microrganismos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Portanto, a grande preocupação é impedir que esses microrganismos estejam associados à matéria-prima e se multipliquem no alimento (GERMANO; GERMANO, 2008). Assim, objetivo deste trabalho foi de isolar *Listeria spp.* e identificar as espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, além de detectar genes de virulência destes e isolar *Staphylococcus aureus* na obtenção do leite e na elaboração de queijos tipo Minas frescal e detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

A coleta de amostras está descrita no item 2.1 do capítulo 2.

2.2. Isolamento de *Listeria spp.* e identificação de espécies e genes de virulência

O protocolo de isolamento foi seguido de acordo com o preconizado pelo “United States Department of Agriculture” (USDA, 1996). A primeira fase foi o enriquecimento seletivo primário. Para este, as amostras de água, ao chegar ao laboratório, foram filtradas em membrana filtrante esterilizada, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm (VICENTE et al., 2006), que posteriormente foram depositadas em frascos contendo 50 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria spp.* (LEB).

Cada queijo foi cortado em vários pedaços, e amostras representativas foram unidas em uma amostra de 25 g a qual foi colocada em um saco estéril contendo 225 mL de caldo LEB. A mistura foi homogeneizada em Stomacher® por 2 min e transferida para frascos. Alíquotas de 10 mL de soro dos queijos foram transferidas para frascos contendo 90 mL de caldo LEB. E, alíquotas de 25 mL de leite foram transferidos para frascos contendo 225 mL de caldo LEB. Já os tubos contendo os suabes e água peptonada (incluindo aqueles contendo fezes bovinas) foram agitados no vórtex no laboratório para uma homogeneização adequada. O período de incubação

foi de 30°C por 24h.

Em seguida foi feito o enriquecimento seletivo secundário. Após a incubação, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL do enriquecimento seletivo primário para frascos contendo 10 mL de caldo Fraser (com suplemento para *L. monocytogenes*), os quais foram incubados a 35°C por 24h. Posteriormente, a partir do caldo de enriquecimento secundário, uma alçada da cultura foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Oxford Modificado (MOX), em forma de estrias de esgotamento. O período de incubação ocorreu a 35°C por 24h (USDA, 1996).

No ágar MOX, as colônias típicas de *Listeria* spp. são pequenas (em torno de 1 mm de diâmetro), possuem coloração negra e são rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina (Figura 1). De cada amostra, três a cinco colônias típicas de *Listeria* spp. foram semeadas em tubos contendo caldo BHI (USDA, 1996). Estes foram incubados a 37°C por 24h para posterior extração do DNA, e outra alíquota foi congelada a -80°C em uma solução contendo 20% de glicerol.



Figura 1. Placa MOX com colônias putativas de *Listeria* spp., negras, pequenas (1 mm) e rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.

A identificação dos isolados como *Listeria* spp. foi confirmada por PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos DG75 e DG76 (CHOI; HONG, 2003). Já a espécie *L. monocytogenes* foi identificada utilizando os oligonucleotídeos monoA e Lis1B (BUBERT et al., 1999), e para a identificação dos três genes codificadores de fator de virulência *plcA*, *iap* and *hly* utilizaram os oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Rantsiou et al. (2012). Os isolados positivos para *Listeria* spp. na PCR e negativos para *L. monocytogenes* foram submetidos à PCR para pesquisa das espécies *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, espécies estas já relatadas como agentes causais de infecção em seres humanos (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para a identificação de *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, e para os três genes codificadores de fator de virulência de *L. monocytogenes* *plcA*, *iap* and *hly*, tamanho do produto de amplificação, temperatura de pareamento, controle positivo e sua respectiva referência.

	Oligonucleotídeo os iniciadores	Sequência	Tamanho (pb)	Temperatura de pareamento (°C)	Controle positivo	Referência
<i>Listeria</i> spp	DG75	GACCGCAAGGTTGAAACTCA	421	60	ATCC19114	Choi; Hong, 2003
	DG76	CAGCCTACAATCCGAACTGA				
<i>L. monocytogenes</i>	<i>monoA</i>	CAAAGTCTAACACAGCTACT	660	58	ATCC19114	BUBERT et al., 1999
	<i>Lis1B</i>	TTATACGCGACCGAAGCCAAC				
<i>L. ivanovii</i>	<i>iva1</i>	CTACTCAAGCGCAAGCGGCAC	1100	58	IAL 1983	BUBERT et al., 1999
	<i>Lis1B</i>	TTATACGCGACCGAAGCCAAC				
<i>L. innocua</i>	<i>ino2</i>	ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC	870	58	ATCC 33090	BUBERT et al., 1999
	<i>Lis1B</i>	TTATACGCGACCGAAGCCAAC				
<i>L. seeligeri</i>	<i>Sel1</i>	TACACAAGCGGCTCCTGCTCAA C	1100	58	IAL 2370	BUBERT et al., 1999
	<i>Lis1B</i>	TTATACGCGACCGAAGCCAAC				
Fatores de virulência para <i>L. monocytogenes</i>	<i>plcA_f</i>	CTAGAAGCAGGAATACGGTACA	115	50	ATCC19114	RANTSIOU et al., 2012
	<i>plcA_r</i>	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT				
	<i>iap_f</i>	ACAATACTAATACACCATCTAA	138	50	ATCC19114	RANTSIOU et al., 2012
	<i>iap_r</i>	GAGCTTCAGCAATAATAGC				
	<i>hly_f</i>	TACATTAGTGGAAGATGG	150	54	ATCC19114	RANTSIOU et al., 2012
<i>hly_r</i>	ACATTCAAGCTATTATTTACA					

2.3. Isolamento de *Staphylococcus aureus* e detecção dos genes de enteroxinas

Alíquotas de 100 mL das amostras de água foram filtradas em membrana filtrante esterilizada, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, segundo Vicente et al. (2006), imediatamente após a chegada ao laboratório. Posteriormente, as membranas foram cortadas com tesoura estéril e depositadas em frascos contendo 50 mL de caldo BHI.

Cada queijo foi cortado em vários pedaços, e amostras representativas foram unidas em uma amostra de 25 g a qual foi colocada em um saco estéril contendo 225

mL de caldo BHI. A mistura foi homogeneizada em Stomacher® por 2 min e transferida para frascos. Alíquotas de 10 mL de soro dos queijos foram transferidas para frascos contendo 90 mL de caldo BHI. E, alíquotas de 25 mL de leite foram transferidos para frascos contendo 225 mL de caldo BHI. Os queijos foram mantidos em geladeira, à 4°C e analisados semanalmente (análises no dia 0, 7, 14, 21 após a colheita dos queijos). Assim, dez queijos, sendo dois de cada propriedade, foram estocados sob refrigeração por até 21 dias.

Já os tubos contendo os suabes e água peptonada (incluindo aqueles contendo fezes bovinas) foram agitados no vórtex no laboratório para uma homogeneização adequada. Em seguida, 1mL desta solução foi adicionado a frascos contendo 5 mL de caldo BHI. O período de incubação de todas as amostras foi realizado a 37°C por 24h (APHA, 2001).

Uma alçada de cada amostra cultivada em caldo BHI foi semeada em placas de Petri contendo ágar Baird Parker, em forma de estrias de esgotamento. O período de incubação ocorreu a 37°C por 48h. Posteriormente, três colônias características de *Staphylococcus* spp. de cada amostra foram semeadas em tubos contendo ágar nutriente inclinado, os quais foram incubados a 35°C por 24h (APHA, 2001). Após incubação, esfregaços foram preparados e corados pelo método de Gram, e as culturas que se apresentaram na forma de cocos Gram-positivos, formando massas irregulares em forma de cachos de uva, foram consideradas sugestivas de *Staphylococcus* spp.. Tais isolados positivos foram submetidos à prova da coagulase livre (MACFADDIN, 1976).

Todos os isolados característicos, cocos Gram-positivos, foram submetidos à extração de DNA por fervura e à PCR para confirmação do gênero e detecção da espécie *S. aureus*. Os isolados identificados como *S. aureus*, foram testados quanto à presença do gene *coa*, para coagulase-positivo, e quanto à presença de genes codificadores de toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *tst*, *eta*, *pvl* e *hlg*) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para a identificação do gênero *Staphylococcus* spp., espécie *S. aureus*, e para os genes codificadores de toxina de *S. aureus* *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* *tst*, *eta*, *etb*, *pvl* e *hlg*, tamanho do produto de amplificação, temperatura de pareamento, controle positivo e sua respectiva referência.

	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Tamanho (pb)	Temperatura de pareamento (°C)	Controle positivo	Referência
<i>Staphylococcus</i> spp	16sRNA	GTA GGT GGC AAG CGTTAT CC CGC ACA TCA GCG TCA G	228		ATCC25923	PEREIRA et al., 2009
<i>S. aureus</i>	Sa442	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATAACAACA	102	55	ATCC25923	MOROT-BIZOT et al., 2004
<i>S. aureus</i>	TstaG422/765	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA	370		ATCC25923	MOROT-BIZOT et al., 2004
Gene que codifica coagulase de <i>S. aureus</i>	<i>coa</i>	AGAAGGTCTTGAAGGTAGC GAATCTTGGTCTCGCTTC	250	55	ATCC6538	BLICKWEDE et al., 2005
Genes que codificam proteínas de toxinas de <i>S. aureus</i>	<i>sea</i>	TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC TGGTGTACCACCCGCACATTGA	252	60	ATCC23235	
	<i>seb</i>	GACATGATGCCTGCACCAGGAGA AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG	355	60	ATCC14458	
	<i>sec</i>	CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA CGCCTGGTGCAGGCATCATATC	602	60	ATCC19095	
	<i>sed</i>	GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG CCGCGCTGTATTTTCTCCGAGAG	830	60	ATCC23235	PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012
	<i>see</i>	TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA TCCGTGTAATAATGCCTTGCCTGAA	532	60	ATCC27664	
	<i>seg</i>	TGCTCAACCCGATCCTAAATTAGACGA CCTCTTCCCTTAACAGGTGGAGACG	117	60	ATCC25923	
	<i>seh</i>	CATTCACATCATATGCGAAAGCAGAAG GCACCAATCACCTTTCTGTGC	358	60	ATCC19095	

<i>sei</i>	TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA TCCATATTCTTTGCCTTTACCAGTG	220	60	ATCC19095
<i>tst</i>	AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG	306	60	ATCC25923
<i>eta</i>	CGCTGCGGACATTCTACATGG TACATGCCCCGCCACTTGCTTGT	676	60	TC-142
<i>pvl</i>	TGCCAGACAATGAATTACCCCCATT TCTGCCATATGGTCCCCAACCA	894	60	ATCC25923
<i>hlg</i>	TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA CGCCTGCCCAGTAGAAGCCATT	306	60	ATCC19095

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de *Listeria* spp. e identificação de espécies e genes de virulência

O presente estudo detectou o gênero *Listeria* spp. em 63,21% do total de amostras das cinco propriedades, sendo que na propriedade A, 36,36% das amostras foram positivas, 56,52% da propriedade B, 61,90% da propriedade C, 66,66% da propriedade D e 100% da propriedades E (Tabela 3). Esta alta percentagem pode ser justificada pelo fato de que com exceção da propriedade B, todas as demais propriedades não possuíam o solo pavimentado na sala de ordenha e, *Listeria* spp. está amplamente distribuída na natureza, sendo o solo um habitat importante para a persistência desse gênero bacteriano no mundo (LINKE et al., 2014).

Tabela 3. Detecção de *Listeria* spp. nas cinco propriedades rurais produtoras de queijos tipo Minas frescal, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

Propriedade	Nº amostras contaminadas/Total de amostras (%)	Amostras contaminadas (Número de isolados obtidos)
A	8/22 (36,36%)	Leite, Fezes bovinas (5), Queijo (1), Fôrmas
B	13/23 (56,52%)	Água (2), Leite, Fezes bovinas (5), Superfície de elaboração de queijos, soro, Queijos (2) Fôrmas
C	13/21 (61,90%)	Água sala elaboração de queijo, Leite, Fezes bovinas (5) Mãos manipulador de queijo, Soro, Queijo (2), Termômetro, Colher para cortar o coalho
D	14/21 (66,66%)	Água sala elaboração de queijo, Fezes bovinas (5), superfície elaboração queijo, Soro, Queijo (2), Peneira (2), Balde, Colher para cortar o coalho
E	19/19 (100%)	Água sala elaboração de queijo, Leite, Fezes bovinas (5), Mãos do ordenhador, Balde (2), Mãos manipulador do queijo, Superfície de elaboração do queijo, Soro, Queijo (2), Peneira (3), Fôrmas
Total	67/106 (63,21%)	-

O presente estudo teve alta prevalência de *Listeria* spp. nas amostras de quatro das cinco propriedades. Em contrapartida, em amostras de leite a granel de 98 propriedades no nordeste da Espanha foi encontrada prevalência de 16,3% nas amostras (VILAR et al., 2007). Um outro estudo relatou que a prevalência de *Listeria* spp. em amostras de leite de vacas com mastite no Irã foi de 10,1%. Esses autores sugerem que, tendo em vista o potencial zoonótico de *Listeria* spp. e o risco de contaminação do leite e dos derivados lácteos, existe necessidade de vigilância contínua para esse gênero nestes alimentos (JAMALI; RADMEHR, 2013). Uma pesquisa, na Etiópia, de leite e derivados lácteos, mostrou que *Listeria* spp. estava presente em 28,4% das amostras, mais especificamente em 60% dos queijos, 40% dos leites pasteurizados, 18,9% do leite cru e 5% dos iogurtes (SEYOUM et al., 2015).

Apesar de a *Listeria* spp. estar em alta percentagem das amostras, as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, de importância em saúde pública, pois são patogênicas para o ser humano, não foram detectadas em nenhuma das amostras (Figura 2), em nenhuma das propriedades estudadas. Em contrapartida, outros estudo detectaram essas espécies em alimentos. Em um estudo de amostras de leite de vacas com mastite no Irã, a prevalência de *L. monocytogenes* foi de 8,21%, a de *L. innocua* foi de 1,45% e a de *L. ivanovii* foi de 0,48% (JAMALI; RADMEHR, 2013). *L. monocytogenes* também foi detectada em 6,1% das amostras de leite a granel em tanques de 98 propriedades no nordeste da Espanha e *L. innocua* em 7,1%. Em contrapartida, neste mesmo estudo, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* não foram detectadas (VILAR et al., 2007). A pesquisa em leite e derivados na Etiópia mostrou *Listeria monocytogenes* presente em 5,6% das amostras de leite e derivados, como queijos e iogurtes (SEYOUM et al., 2015).

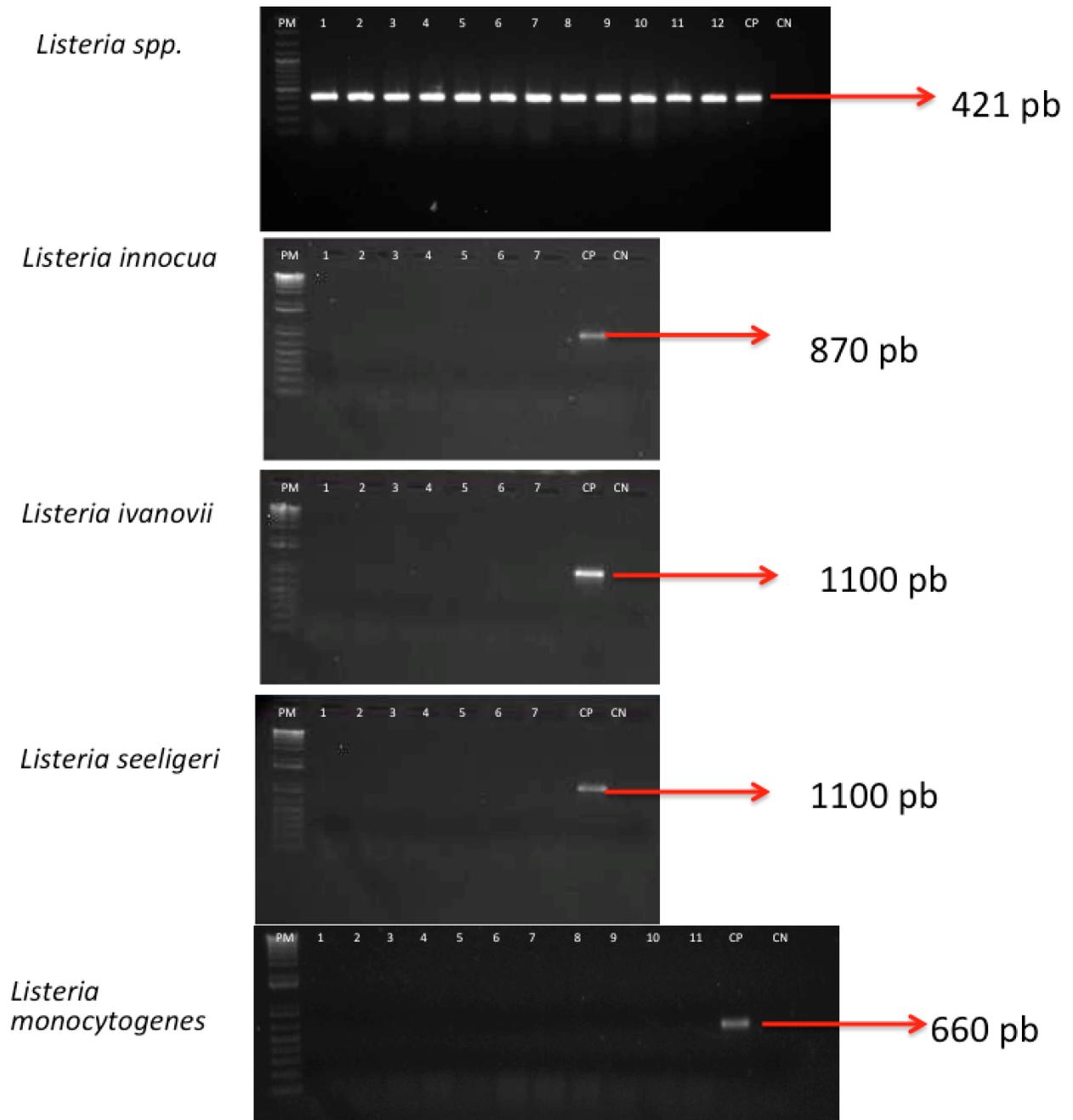


Figura 2. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR para a detecção do gênero *Listeria spp.* e das espécies *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*. PM: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®); 1 a 12 ou 1 a 11 ou 1 a 7 são amostras; CP (controle positivo), CN (controle negativo).

Esses estudos demonstram que *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. monocytogenes* estão presentes em muitos alimentos de origem animal, principalmente de leite cru e derivados do leite, porém diferem do atual estudo.

Além disso, a presença de *Listeria* spp., principalmente em alta percentagem como no presente estudo, representa potencial risco de contaminação dos queijos elaborados a partir de leite cru e exige uma vigilância contínua para a presença deste gênero.

3.2. Isolamento de *Staphylococcus aureus* e detecção dos genes de enteroxinas

Isolaram-se 81 *Staphylococcus* spp. da propriedade A, 94 da propriedade B, 73 da propriedade C, 69 da propriedade D e 74 da propriedade E. Em seguida, a identificação dos isolados em gênero foi confirmada por PCR e procedeu-se a identificação da espécie *S. aureus* (Figura 3). A percentagem desta espécie foi de 11,11% (9 isolados) na propriedade A, 7,45% (7 isolados) na propriedade B, 1,37% (1 isolado) na propriedade C, 20,29% (14 isolados) na propriedade D e 39,19% (29 isolados) na E. Observou-se que em todas as propriedades, a maior prevalência de *S. aureus* ocorreu em amostras dos queijos e que a propriedade E foi a que apresentou maior percentagem de isolados *S. aureus* (Tabela 4). Tal fato possivelmente está associado ao fato da pessoa que produziu os queijos nesta propriedade não utilizar luvas e, ainda, não estar com as unhas aparadas e utilizar acessórios nos dedos como anéis. Estes acessórios são propícios para a formação de biofilmes e podem veicular microrganismos e contaminar alimentos (SCHLEGELOVÁ; KARPÍSKOVÁ, 2007).

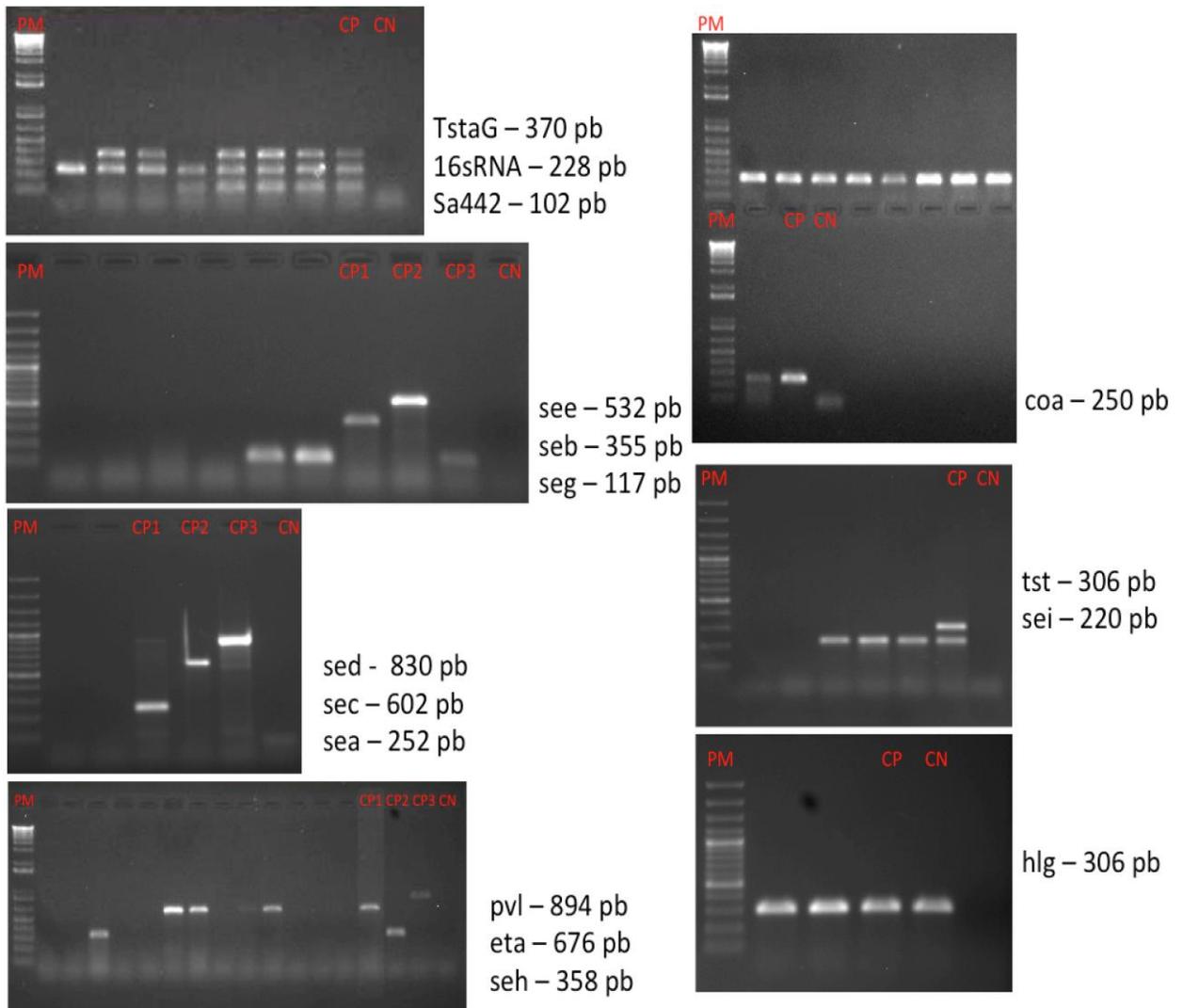


Figura 3. Eletroforese de produtos de amplificação por PCR para a confirmação do gênero *Staphylococcus spp.*, da espécie *S. aureus*, e para detecção dos genes codificadores de toxina de *S. aureus* *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* *tst*, *eta*, *etb*, *pvl* e *hlg*. PM: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®); CP (controle positivo), CN (controle negativo).

Tabela 4. Detecção de *S. aureus* e enterotoxinas encontradas nas amostras das 5 propriedades rurais produtoras de queijos tipo Minas frescal, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

Propriedade	Amostra	Número de isolados	Enterotoxina(s) encontrada
A	Leite	1	<i>hlg</i>
	Mãos manipulador de queijo	1	<i>hlg</i>
	Queijo 2 - 1a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 1- 3a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 2 - 4a semana	3	<i>hlg</i>
B	Queijo 2 - 1a semana	3	<i>seh, hlg</i>
	Queijo 2 - 2a semana	1	<i>seh, hlg</i>
	Queijo 2 - 2a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 1- 3a semana	1	<i>hlg</i>
C	Soro	1	<i>seg, sei, hlg</i>
D	Leite	2	<i>hlg</i>
	Balde	3	<i>hlg</i>
	Peneira	3	<i>seg, eta, sei, hlg</i>
	Queijo 1 - 2a semana	4	<i>hlg</i>
	Queijo 1 - 3a semana	2	<i>hlg</i>
E	Leite	2	<i>hlg</i>
	Fezes bovina	1	<i>hlg</i>
	Balde	1	<i>hlg</i>
	Peneira para coar leite	1	<i>hlg</i>
	Balde após coar leite	2	<i>seg, eta, sei, hlg</i>
	Peneira para coar o coalho	2	<i>hlg</i>
	Queijo 1- 1a semana	1	<i>hlg</i>
	Queijo 1- 1a semana	1	<i>seg, eta, sei, hlg</i>
	Queijo 2- 1a semana	1	<i>seg, eta, sei, hlg</i>
	Queijo 2- 1a semana	3	<i>hlg</i>
	Queijo 1 - 2a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 2 - 2a semana	1	<i>hlg</i>
	Queijo 1 - 3a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 2 - 3a semana	2	<i>hlg</i>
	Queijo 2 - 3a semana	1	<i>hlg</i>
Queijo 1 - 4a semana	1	<i>hlg</i>	
Queijo 2 - 4a semana	5	<i>hlg</i>	

O gene codificador da enterotoxina *hlg* foi encontrado em todos os isolados de *S. aureus* do presente estudo. Esse gene é codificador da gama-hemolisina, a qual possui ação pró-inflamatória, sendo capaz de lisar leucócitos e eritrócitos (CUNHA, CALSOLARI, 2008). Esse gene também foi o mais comumente encontrado na Finlândia, entre isolados de *S. aureus* coletados de infecções intramamárias e também de pele do teto da vaca leiteira, canais dos tetos, lesões de pele, mãos e narinas de ordenhadores (HAVERI et al., 2008). Além disso, esse gene também foi detectado em 96,3% dos isolados de *S. aureus* em cateteres de hemodiálise, em pacientes mexicanos, seguido de 92,7% do gene *seg*, 85,4% do gene *sei* e 78,1% do gene *seh* (PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012), genes encontrados em isolados *S. aureus* de queijos elaborados a partir de leite cru do presente estudo, mostrando o potencial risco desse alimento em causar infecções ou intoxicações em humanos.

Outros estudos também demonstraram genes codificadores de enterotoxinas de *S. aureus* circulando entre diferentes pontos da obtenção do leite e na produção de queijos. Uma pesquisa, na Argentina, em amostras de leite de tanque, encontrou 7,4% com gene de enterotoxina C, 2,1% com gene de enterotoxina D, 1,1% com gene de enterotoxina B e 1,1% com gene de enterotoxinas C, D e E (NEDER; CANAVESIO; CALVINHO, 2011). Além disso, um trabalho no Irã analisou amostras de queijo e amostras de leite e encontrou o gene *sea* em 12,96% dos isolados de *S. aureus*, em ambas as amostras. (SAADAT et al., 2014). Esses dados, juntamente com os do presente estudo, demonstram que isolados de *S. aureus* portadores de genes codificadores de enterotoxinas estão circulando entre amostras de leite, mãos de manipuladores de queijo, soro, balde, peneira e queijo, comprovam, então, o potencial risco à saúde pública do consumo do queijo elaborado a partir de leite cru e a necessidade de maior fiscalização frente à produção desse alimento.

4. CONCLUSÕES

Isolou-se *Listeria* spp. de diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal, entretanto não se detectou as espécies *L. innocua*, *L.*

seeligeri, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*. Isolou-se *S. aureus* e detectou-se importantes genes codificadores de enterotoxinas em diferentes pontos da obtenção do leite e da elaboração de queijos tipo Minas frescal. Conclui-se também que a elaboração de queijos a partir de leite cru refrigerado realizada sob má condições higiênicas e sanitárias podem contaminar o produto final, o queijo, com bactérias Gram-positivas de importância em saúde pública.

5. REFERÊNCIAS

APHA – American Public Health Association. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4^a. ed. Washington: American Public Health Association, 2001.

BLICKWEDE, M., WOLZ, C., VALENTIN-WEIGAND, P., SCHWARZ, S., Influence of clindamycin on the stability of *coa* and *fnbB* transcripts and adherence properties of *Staphylococcus aureus* Newman. **FEMS Microbiology Letters**. 252. 73–78. 2005.

BORELLI, B. M., FERREIRA, E. G., LACERDA, I. C. A., FRANCO, G. R., & ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22, 1115e1119., 2006.

BUBERT, A., HEIN, I., RAUCH, M., LEHNER, A. YOON, B., GOEBEL, W., WAGNER, M. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 4688–4692, 1999.

CHOI, W. S., HONG, C. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. **International Journal of Food Microbiology**. 84, 79–85. 2003.

CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y., HERMAN, L.. Raw or heated cow 451 milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**. 452;31:251–262. 2013.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology Insights**, v. 1, p. 13-24, 2008.

DUARTE, D. A., SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e

microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2005.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F., NASSU, R. T., AZEVEDO, E. H. I. de., MUNIZ, C. R. Pesquisa de Salmonella sp, Listeria sp e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 23. suppl., p. 162-165, 2003.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, p 204-208, 2008.

HAVERI, M., HOVINEN, M., ROSLÖF, A., PYÖRÄLÄ, S. Molecular types and genetic profiles of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **J Clin Microbiol.** 2008. 46(11):3728-35.

JAMALI, H., RADMEHR, B. Frequency, virulence genes and antimicrobial resistance of Listeria spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Vet J.** 198(2):541-2. 2013.

LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. dos. Ocorrência de Staphylococcus aureus em queijo Minas tipo Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 89-93, jun. 2005.

LIMA, C. D. C., LIMA, L. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., FERREIRA, E. G., ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61, 266e272, 2009.

LINKE, K.; IRENE RÜCKERL, BRUGGER, K.; KARPISKOVA' R.; WALLAND, J.; MURIKLINGER, S.; ALEXANDER TICHY, A.; WAGNER, M. ;STESSL, B. Reservoirs of Listeria Species in Three Environmental Ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, 80 (18) 2014.

LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Revista Ciência Rural**, v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** The Williams e Wikins Co, Baltimore, 312p. 1976

MOROT-BIZOT, S. C., TALON, R., LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of Staphylococcus genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 1087–1094. 2004.

NEDER, V.E., CANAVESIO, V.R., CALVINHO, L.F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. **Rev Argent Microbiol.** 43(2):104-6. 2011.

OKURA, M. H. A contaminação em salgados (coxinhas) encontrados no centro da cidade de Uberaba, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, Jun. 2005.

PANIAGUA-CONTRERAS, G., SÁINZ-ESPUÑES, T., MONROY-PÉREZ, E., RODRÍGUEZ-MOCTEZUMA, J. R., ARENAS-ARANDA, D., NEGRETE-ABASCAL, E., VACA, S. Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. **Advances in Microbiology**. 2, 476-487. 2012.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**. v. 26, p. 278-282, 2009.

RANTSIOU, K.; MATARAGAS, M.; ALESSANDRIA, V.; COCOLIN, L. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 161-168, 2012.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo de Minas Frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 2, p. 236-272, 2006.

SAADAT, Y.R., FOOLADI, A.A.I., SHAPOURI, R., HOSSEINI, M.M., KHIABANI, Z.D. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iran J Microbiol.** 6(5):345-9. 2014.

SALOTTI, B. M., CARVALHO, A.C.F.B., AMARAL, L.A., VIDAL-MARTINS, A.M.C, CORTEZ, A.L. Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Comercializado No Município De Jaboticabal, Sp, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, abr./jun., 2006.

SCHLEGELOVÁ, J., KARPÍSKOVÁ, S. Microbial biofilms in the food industry. **Epidemiol Mikrobiol Imunol.** 56(1):14-9. 2007.

SEYOUM, E.T., WOLDETSADIK, D.A., MEKONEN, T.K., GEZAHEGN, H.A., GEBREYES, WA. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. **J Infect Dev Ctries.** 9(11):1204-9. 2015.

U.S. **Department of Agriculture (USDA)**, 1996. Disponível em: <http://www.usda.gov/documents/usda-factbook-1996.pdf>. Acesso em 06 de novembro de 2016.

VICENTE, H. I. G.; **Epidemiologia molecular de cepas de Escherichia coli O157, O111 e O113 produtoras de shigatoxina, isoladas de diferentes tipos de amostras de propriedades leiteiras.** Jaboticabal, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

VILAR, M.J., YUS, E., SANJUÁN, M.L., DIÉGUEZ, F.J., RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Prevalence of and risk factors for Listeria species on dairy farms. **J Dairy Sci.** 90(11):5083-8. 2007.

CAPÍTULO 4 – Prevalência, caracterização molecular e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina detectados em diferentes pontos da obtenção de leite e produção de queijos tipo Minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado

RESUMO – O uso indiscriminado da meticilina, recém-sintetizada penicilina beta-lactamase precursora do grupo da meticilina e oxacilina, provocou o surgimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS). Isolados MRS pode ser encontrados em vários tipos de alimentos, incluindo leite e queijo. A busca de MRS em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos tipo Minas frescal em propriedades leiteiras e a análise da sua diversidade genética são importantes para a elucidação da sua epidemiologia. Tais análises podem contribuir para a tomada de iniciativas no controle desses patógenos e a implantação de medidas visando evitar sua disseminação. Desta forma, este estudo objetivou isolar e caracterizar *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina presentes no processo de obtenção do leite e elaboração de queijos tipo Minas frescal. Para tanto, foram realizadas coletas em cinco pequenas propriedades rurais produtoras deste tipo de queijo no nordeste do Estado de São Paulo. Foram coletadas amostras de suabes de fezes bovinas, amostras de mãos de ordenhador, balde de ordenha, leite, soro, água, superfície de elaboração de queijos, mãos de manipulador do queijo, peneiras, bandejas, fôrmas e escumadeiras. Primeiramente, isolou-se colônias putativas de *Staphylococcus* spp. em placas contendo ágar manitol salgado às quais foram submetidas à PCR multiplex para confirmação do gênero *Staphylococcus* spp., da espécie *S. aureus* e identificação do gene *mecA*. Os isolados MRS foram encontrados em queijos e mãos de manipuladores de queijos. Tais isolados foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos, inclusive para confirmar a expressão do gene *mecA*. Estes foram resistentes à oxacilina, penicilina e cefepime. Os isolados MRS obtidos foram identificados pelo sequenciamento gênico como *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. epidermidis*. Segundo a diversidade genética entre os isolados, obtida pelo emprego de marcadores moleculares RAPD, houve similaridade genética entre isolados encontrados nas mãos dos manipuladores e nos queijos. Assim, conclui-se que os humanos constituem-se em fonte de contaminação na obtenção do leite e de seus derivados, como o queijo Minas frescal, por *Staphylococcus* spp. multi-resistentes, que representam um potencial risco à saúde pública.

Palavras-chaves: MRS, Sequenciamento, RAPD, saúde pública

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado da meticilina, recém-sintetizada penicilina beta-lactamase precursora do grupo da meticilina e oxacilina, provocou o surgimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS), os quais representam alto risco à saúde pública. A espécie MRS mais citada é o *Staphylococcus aureus* (MRSA). A detecção da MRS em unidades veterinárias de diferentes países (VAN DUIJKEREN et al., 2004; WEESE et al., 2004) e a probabilidade de transmissão entre os animais e o ser humano (JUHA'SZ-KASZANYITZKY et al., 2007) demonstraram a importância de monitorar tais microrganismos e o seu nível de resistência antimicrobiana.

Isolados MRSA são obtidos de vários tipos de alimentos, incluindo carne de suínos, leite e queijo (NORMANNO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009.; PU et al., 2009). A importância da presença de MRS e MRSA em ambientes rurais e alimentos se fundamenta na possível infecção de consumidores e pessoas que entram em contato com animais, que acabam se tornando fonte de infecção destes agentes patogênicos. Tal importância foi evidenciada no trabalho de Van Rijen et al. (2008), que sugeriu que produtores que têm contato com suínos e bezerros têm grande risco de serem portadores de MRSA.

A busca de MRS em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos tipo Minas frescal elaborados em propriedades leiteiras e a análise da sua diversidade genética são importantes para a elucidação da sua epidemiologia. Tais análises podem contribuir para a tomada de iniciativas no controle desses patógenos e a implantação de medidas visando evitar sua disseminação. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina na obtenção do leite e na elaboração de queijos tipo Minas frescal e caracterizar os isolados por sensibilidade a antimicrobianos, sequenciamento gênico e análise de diversidade genética.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

A coleta de amostras está descrita no item 2.1 do capítulo 2.

2.2. Isolamento de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) na obtenção do leite e na produção de queijos tipo Minas Frescal

O isolamento de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) foi realizado de acordo com Aquino et al., (2012). Para tanto, alíquotas de 100 mL das amostras de água foram filtradas em membrana filtrante esterilizada, com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, segundo Vicente et al. (2006), imediatamente após a chegada ao laboratório. Posteriormente, as membranas foram cortadas com tesoura estéril e depositadas em frascos contendo 50 mL de caldo BHI suplementado com cloreto de sódio (NaCl) 6%. Cada queijo foi cortado em vários pedaços, e amostras representativas foram unidas em uma amostra de 25 g a qual foi colocada em um saco estéril contendo 225 mL de caldo BHI suplementado com NaCl 6%. A mistura foi homogeneizada em Stomacher® por 2 min e transferida para frascos. Alíquotas de 10 mL de soro dos queijos foram transferidas para frascos contendo 90 mL de caldo BHI suplementado com NaCl 6%. E, alíquotas de 25 mL de leite foram transferidos para frascos contendo 225 mL de caldo BHI suplementado com NaCl 6%. Já os tubos contendo os suabes e água peptonada (incluindo aqueles contendo fezes bovinas) foram agitados no vórtex no laboratório para uma homogeneização adequada. Em seguida, 1mL desta solução foi adicionado a frascos contendo 5 mL de caldo BHI suplementado com NaCl 6%. O período de incubação de todas as amostras foi realizado a 37°C por 24h.

Uma alçada de cada cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar manitol salgado com oxacilina (2 µg.ml⁻¹), em forma de estrias de esgotamento. A incubação ocorreu a 37°C por 48 h. Este meio de cultura contendo isolados sugestivos

de *Staphylococcus* spp. permanece na cor rósea, ao passo que a coloração amarelada do meio é sugestiva de *S. aureus* (Figura 1). Assim, uma a cinco colônias características de *Staphylococcus* spp. em ágar manitol salgado foram semeadas em tubos contendo ágar nutriente inclinado, os quais foram incubados a 35°C por 24h.

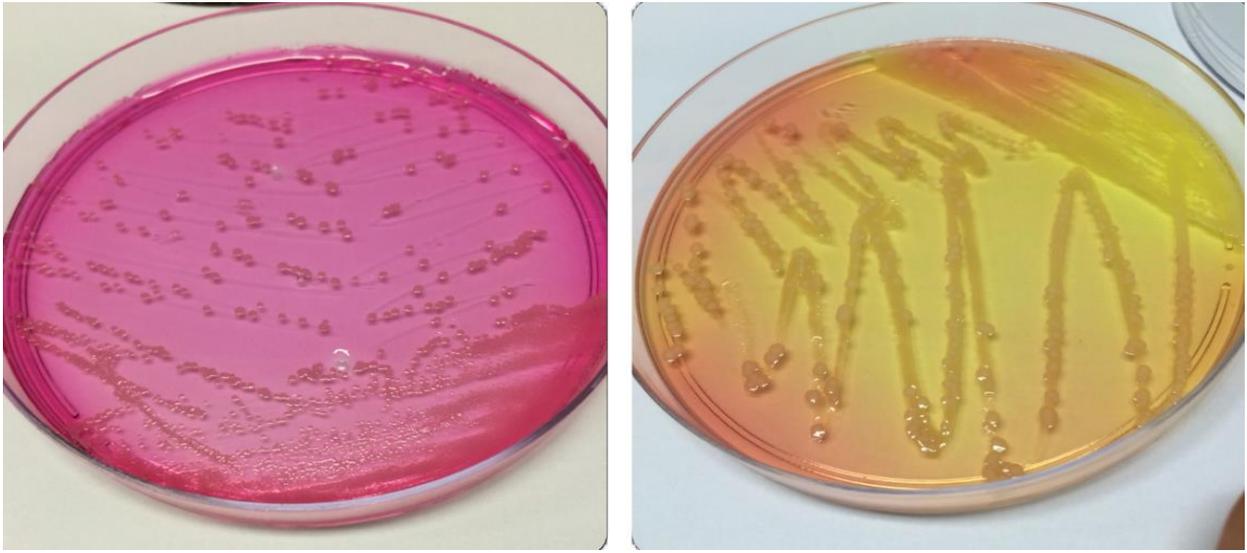


Figura 1. Placas contendo ágar manitol salgado com colônias putativas de *Staphylococcus* spp. na imagem à esquerda, e putativas da espécie *S. aureus* na placa à direita.

Após incubação, esfregaços foram preparados e corados pelo método de Gram, e as culturas que se apresentaram na forma de cocos Gram-positivos, formando massas irregulares em forma de cachos de uva foram consideradas sugestivas de *Staphylococcus* spp. (MACFADDIN, 1976).

Todos os isolados característicos, cocos Gram-positivos, foram submetidos à extração de DNA por fervura e à PCR para confirmação do gênero *Staphylococcus* spp. e da espécie *S. aureus*, segundo metodologia descrita no item 3.3 do capítulo 3. Esta reação foi realizada em multiplex com os oligonucleotídeos para identificação do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *MEC-F* (5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C - 3') e *MEC-R* (5' - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C - 3'), desenvolvidos por Gortel et al. (1999), que

amplifica uma banda de 533 pb sob temperatura de pareamento de 55°C.

2.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS

Os isolados MRS foram submetidos ao teste de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão de disco em placas (BAUER et al., 1966). Deste modo, foram utilizados multidiscos de antimicrobianos para microrganismos Gram-positivos (Laborclin) que consistem em unidades plásticas às quais estão aderidos 12 discos de papel com diâmetro de 6 mm, impregnados com princípios ativos para uso em antibiograma por difusão em ágar Müller Hinton em placas de 140 mm de diâmetro (NCCLS, 2000).

Para a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos, isolados de *Staphylococcus* spp. foram semeados em placas de Petri contendo ágar TSA, cujo cultura ocorreu por 24h a 37°C. Primeiramente, a água utilizada para a diluição da cultura teve sua turbidez mensurada em espectrofotômetro. Em seguida, alíquotas da cultura foram transferidas com o auxílio de uma alça estéril para 10 mL de água ultrapura estéril. Esse material foi agitada em vórtex, e sua turbidez foi mensurada até a obtenção da escala 0,5 de MacFarland. A seguir, alíquotas da cultura em água foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após a secagem da superfície do meio, foram colocados os discos contendo os antimicrobianos (BAUER et al., 1966). Os antimicrobianos testados foram: cefepime (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 un), rifampicina (30 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Para avaliação dos resultados, mediu-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco e consultou-se a tabela de parâmetros fornecida pela empresa fabricante dos antimicrobianos (Figura 2).

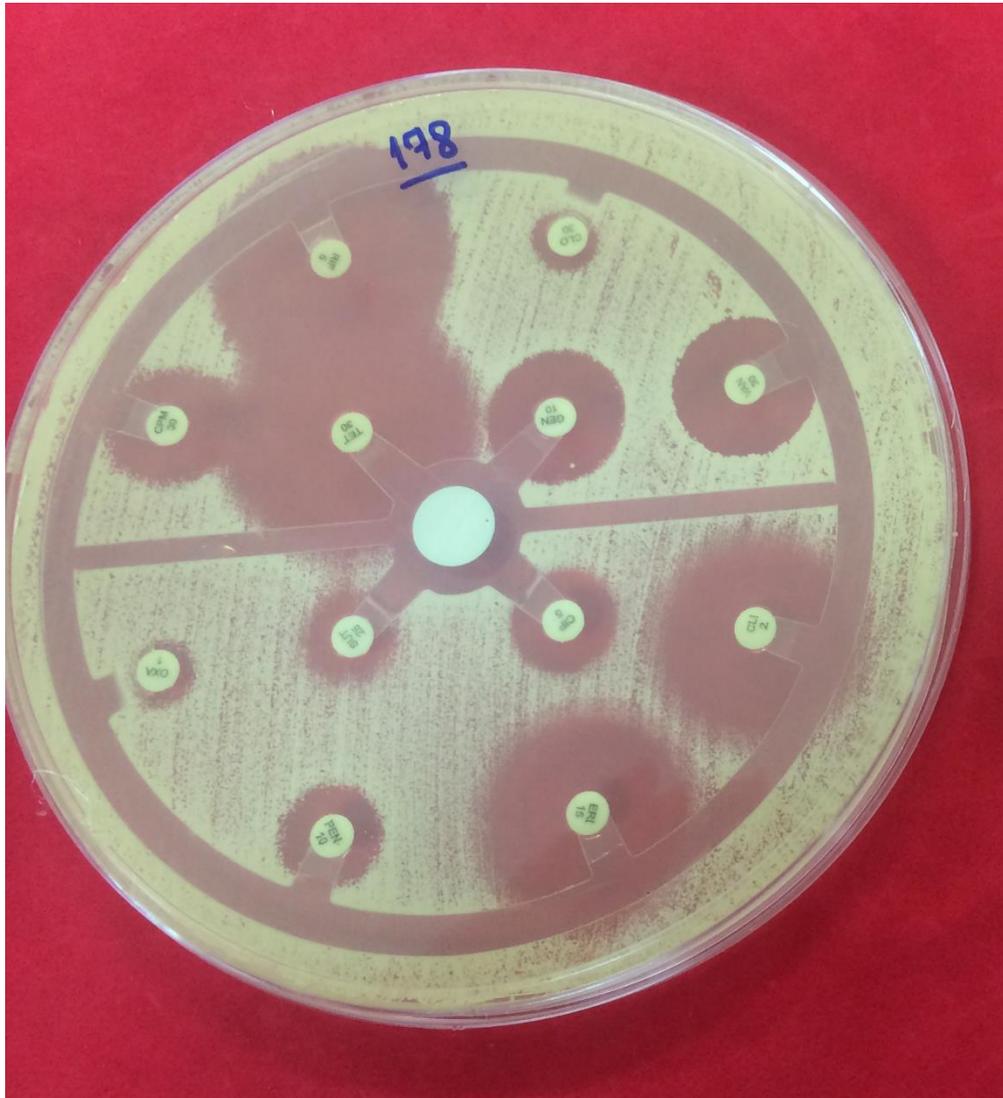


Figura 2. Placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton após período de incubação, mostrando halos de inibição do isolado MRS em questão.

2.4. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD

Para o sequenciamento de genes para identificação das espécies dos isolados MRS e análise de diversidade genética por RAPD, realizou-se a extração de DNA pelo método do clorofórmio, a fim de obter DNA de qualidade e com integridade. Para tanto, a lise celular foi realizada acrescentando-se aos tubos 700 μ L do tampão de extração

de DNA (160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 60 mM de EDTA pH 8.0, 20 mM de NaCl e SDS 0,5%), os quais, após serem agitados, foram mantidos em ThermoMixer (Eppendorf) a 65°C por 40 min. Posteriormente, acrescentaram-se 250 µL de acetato de potássio 5M à solução, que, após ser homogeneizada, foi mantida no gelo por 30 min. A seguir, acrescentaram-se 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e a solução foi agitada vigorosamente em vórtex. Procedeu-se à centrifugação a 12.000 x *g*, a 10°C, por 10 min. O sobrenadante translúcido foi então transferido para tubos novos, aos quais foram acrescentados 1.000 µL de etanol absoluto gelado, cuja solução homogeneizada foi mantida a -20°C por 12h. A seguir, procedeu-se à centrifugação dos tubos a 12.000 x *g*, a 10°C, por 15 min visando a obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado com 1.000 µL de álcool etílico 70% sob nova centrifugação. Após a lavagem, o *pellet* de DNA foi seco em estufa e ressuspenso em 60 µL de solução TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0). A quantidade e a qualidade do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A relação da absorbância entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm resulta no valor referente à qualidade do DNA, desejável entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP. A reação de amplificação dos genes *rpoB-F* (5'-CAA TTC ATG GAC CAA GC- 3'), *rpoB-R* (5'-CCG TCC CAA GTC ATG AAA C-3'), (EUZEBY, 1997), *gap-F* (5'- ATG GTT TTG GTA GAA TTG GTC GTT TA-3'), *gap-R* (5'-GAC ATT TCG TTA TCA TAC CAA GCT G- 3') (YUGUEROS, et al., 2001) e *tuf-F* (5'-TTA TCA CGT AAC GTT GGT G- 3'), *tuf-R* (5'- CAT TTC WGT ACC TTC TGG- 3') (BERGERON et al., 2011) foi realizada utilizando-se tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen), 4 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores específicos, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95°C por 2 min, 37 ciclos a 94°C por 30s, 50°C para *tuf* e 53° para *rpoB* e *gap* por 30s e 72°C por 1 minuto e 40s e, para concluir, um ciclo de 10 min a 72°C. O produto de PCR

amplificado foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 (ThermoFisherScientific) segundo instruções do fabricante.

Os produtos da PCR de sequenciamento foram precipitados em 50 µL de álcool etílico absoluto e 2,5 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0) sob centrifugação a 1.870 x g por 45 min a 14°C. Posteriormente, a fase líquida foi descartada, e o precipitado foi lavado com 50 µL de álcool etílico 70% sob centrifugação a 1.870 x g por 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado, e a placa foi submetida à secagem a 55°C por 10 min. Em seguida, o produto da PCR de sequenciamento foi submetido à desnaturação em formamida Hi-Di (ThermoFisherScientific) a 95°C por 5 min.

A leitura das sequências de nucleotídeos foi realizada em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems), localizado no IPBEN (Instituto de Pesquisa em Bioenergia) – FCAV/UNESP. A qualidade de bases dos eletroferogramas e as sequências consenso foram obtidas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; GREEN, 1996; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O corte das extremidades das sequências consenso foi realizado admitindo-se bases com qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências de DNA qualificadas foram então comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information) pela ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) para a identificação das espécies.

Para as análises filogenéticas, as sequências de cada um dos três genes e as demais sequências do banco de dados foram alinhadas separadamente pelo software MUSCLE (EDGAR, 2004). Como grupos externos foram utilizadas sequências de *Bordetella pertussis* e *Pseudomonas* sp. com números de acesso BX640414.1 e LT222319.1, respectivamente.

Após o alinhamento das sequências, as mesmas foram concatenadas e avaliadas quanto ao modelo evolutivo mais apropriado para as análises segundo o critério de informação de *Akaike* (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). A árvore filogenética foi gerada pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o tipo de substituição seis, distribuição G (Rate variation among sites) e o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), programado para executar as

análises em quatro cadeias simultaneamente, sendo três quentes e uma fria. Foram realizadas quatro corridas independentes com 5.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, cujo desvio padrão desejável é igual ou inferior a 0,01, 25% das árvores geradas foram descartadas como 'burn-in'. O filograma gerado pelo MrBayes foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

Posteriormente, a diversidade genética dos isolados MRS foi analisada utilizando-se os marcadores moleculares RAPD. Para tanto, foram testados 100 oligonucleotídeos (Operon Technologies, California, USA) para a seleção daqueles mais informativos e polimórficos. Dentre os oligonucleotídeos iniciadores testados foram selecionados 12, sendo: OPA4, OPA13, OPA18, OPG14, OPI7, OPM5, OPM12, OPP19, OPQ1, OPQ18, OPR2, OPR12. A reação de amplificação dos fragmentos foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Thermo Scientific), 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 92°C por 3 min, 35 ciclos a 92°C por 60 s, 36°C por um minuto e 45 s e 72°C por 1 minuto e 45 s; para concluir, um ciclo de 10 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5µg/ml). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas, ThermoScientific). A visualização dos fragmentos foi realizada em fotodocumentador GelDoc XR (BioRad).

O padrão de bandeamento obtido foi analisado manualmente, anotando-se o número um para presença de banda e zero para ausência. A matriz binária de presença e ausência de bandas obtida foi utilizada para gerar a matriz de distância (NEI; LI, 1979) e o dendrograma pelo método da distância Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), com *bootstrap* de 1.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985) utilizando o software PAUP versão 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 2002). O dendrograma obtido foi editado graficamente com o auxílio do software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) nos diferentes pontos da obtenção do leite e da produção do queijo tipo Minas frescal

Três a cinco colônias típicas de *Staphylococcus* spp. foram colhidas de cada placa contendo ágar manitol salgado. A identificação dos isolados como *Staphylococcus* spp.(*16sRNA*), *S. aureus* (*Sa442*), e a presença do gene *mec*, codificador da resistência à metilina, foram realizados por PCR multiplex (Figura 3).

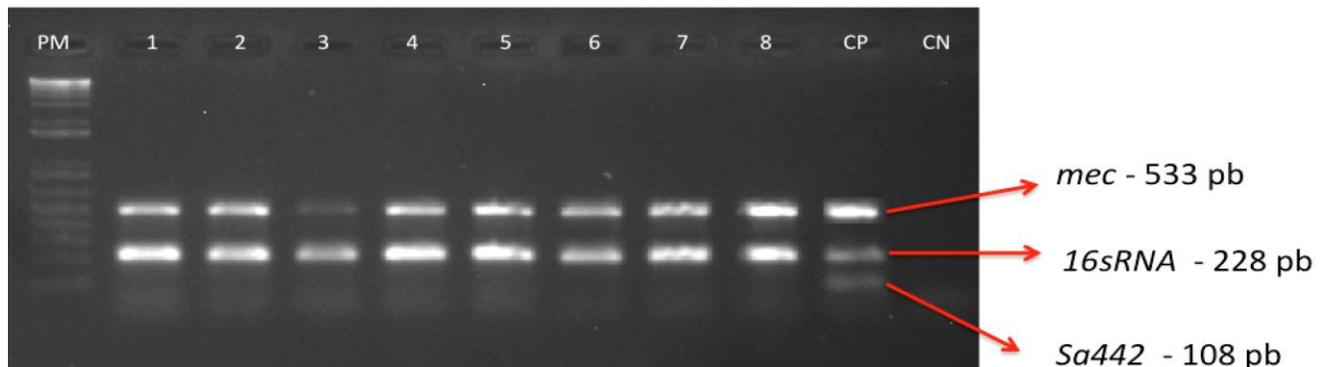


Figura 3. Eletroforese dos produtos de amplificação por PCR para a detecção do gênero *Staphylococcus* spp. (região *16sRNA*), da espécie *S. aureus* (*Sa442*), e do gene *mec*. PM: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®); 1 a 8 são amostras; CP (controle positivo), CN (controle negativo)

Foram obtidos 16 isolados *mecA* positivos do gênero *Staphylococcus* spp. (MRS), nenhum pertencente à espécie *S. aureus*. Três desses isolados são provenientes de mãos de manipulador do queijo da propriedade B, quatro isolados são provenientes de queijos da propriedade B, cinco isolados são de mãos de manipulador de queijo da propriedade C e quatro de queijos da propriedade C. A presença de isolados MRS nestas propriedades pode ser devido à presença de animais com mastite clínica, observada pela presença de grumos no descarte dos primeiros jatos de leite e

consequente uso abusivo e/ou inadequado de antimicrobianos, principalmente na propriedade C, na qual a mastite clínica foi observada em todos os cinco animais. Ademais, destaca-se que na propriedade B usava-se ordenhadeira “balde ao pé” e que o equipamento não foi lavado ao final do uso. A transferência de genes de resistência a diversos antimicrobianos, incluindo tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida, entre vacas leiteiras e os habitantes de uma fazenda já foi relatado na literatura (OPPEGAARD et al, 2001).

3.2. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS

A resistência a antimicrobianos é uma característica importante para *Staphylococcus* spp., pois os genes relacionados com tal resistência são facilmente transferidos a outras estirpes da mesma ou de diferentes espécies pela troca de elementos genéticos. As estirpes que transportam os genes de resistência a antimicrobianos são encontradas em animais, tais como vacas, e podem ser disseminadas em alimentos contendo produtos de origem animal (YOON; LEE; CHOI, 2016). Uma pesquisa de campo relatou que *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) encontrava-se presentes no leite de vacas com mastite e também em queijos elaborados a partir de leite cru, o que indica a possibilidade da disseminação de MRSA de vacas para produtos lácteos (NORMANNO et al, 2007;. VANDERHAEGHEN et al., 2010).

Ademais, estafilococos resistentes à meticilina (MRS) representam risco à saúde pública, pois o uso indiscriminado da meticilina proporcionou a emergência de cepas resistentes à recém-sintetizada penicilina beta-lactamase, precursora do grupo da meticilina, oxacilina, penicilina, antimicrobianos de uso em terapêutica humana.

Os isolados MRS obtidos neste estudo foram sensíveis a rifampicina, vancomicina, clindamicina, gentamicina e tetraciclina e mostraram alta resistência a antimicrobianos como oxacilina, penicilina, cefepime (Tabela 1). Além disso, os isolados da propriedade C também apresentaram resistência à ciprofloxacina, um importante antimicrobiano de uso em terapêutica humana e não de uso veterinário, mostrando que

o ser humano está veiculando isolados com resistência e disseminando através de alimentos.

Tabela 1. Número de isolados MRS (percentagem) resistentes aos antimicrobianos de importância para a medicina humana em cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo a partir de leite cru, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro a março de 2014.

Propriedade	Amostra	No de isolados	Número (Percentagem) de isolados resistentes por antimicrobianos ^a						
			CPM	CLO	ERI	PEN	OXA	SUT	CIP
B	Mãos manipulador queijo	3	3(100)	0	1 (33,33)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	0
	Queijos	4	2 (50)	0	0	4 (100)	4 (100)	2 (50)	0
C	Mãos manipulador queijo	5	2 (40)	0	0	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
	Queijos	4	0	3 (75)	1 (25)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)

^a Antimicrobianos: CPM, Cefepime; CLO, Cloranfenicol; ERI, Eritromicina; PEN, Penicilina; OXA, Oxacilina, SUT, Sulfazotrim; CIP, Ciprofloxacina;

Os isolados do presente estudo apresentaram resistência a antimicrobianos de importância em saúde humana, assim como relatado em um estudo no Egito que detectou 53% de MRSA em leite e produtos lácteos (leite cru, queijo Damietta, queijo Kareish, sorvete e iogurte). Entre esses isolados foram detectadas altas percentagens de resistência aos antimicrobianos penicilina G, cloxacilina, tetraciclina, amoxicilina, sendo de 87,9%, 75,9%, 65,2%, e 55,6%, respectivamente (AL-ASHMAWY et al., 2016).

Além disso, uma pesquisa feita com isolados MRSA de pacientes de um hospital no Irã mostrou 100% de resistentes a penicilina, cefalotina, cefazolina, ceftriaxona e 62% resistente a azitomicina, todos antimicrobianos de importância em saúde humana (MOMTAZ, HAFEZI, 2014). A mesma pesquisa, mas em hospitais no Líbano, mostrou que oxacilina e tetraciclina foram os antimicrobianos com maior percentagem de resistência (TOKAJIAN et al., 2011).

Esses achados sugerem que o leite e os produtos lácteos representam um potencial risco de infecção por multirresistentes devido a práticas de higiene negligenciadas durante as fases de produção de queijos elaborados a partir de leite cru.

Além disso, destaca-se a importância crucial da aplicação de medidas de higiene mais restritivas na produção leiteira para a segurança alimentar.

3.3. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD

Os isolados MRS do estudo foram identificados em espécie pelo sequenciamento de três genes, *rpoB*, *gap* e *tuf*. Pela análise filogenética dos três genes concatenados, os isolados foram classificados em *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. epidermidis* (Figura 4). Pela análise individual dos genes *gap* e *tuf* os isolados 104H.B, 106H.B, 107H.B, 119C.B e 121C.B também foram classificados como *S. haemolyticus*. Apenas pela análise do gene *rpoB* estes isolados foram identificados como *S. hominis*, resultado este prevalecendo na análise filogenética.

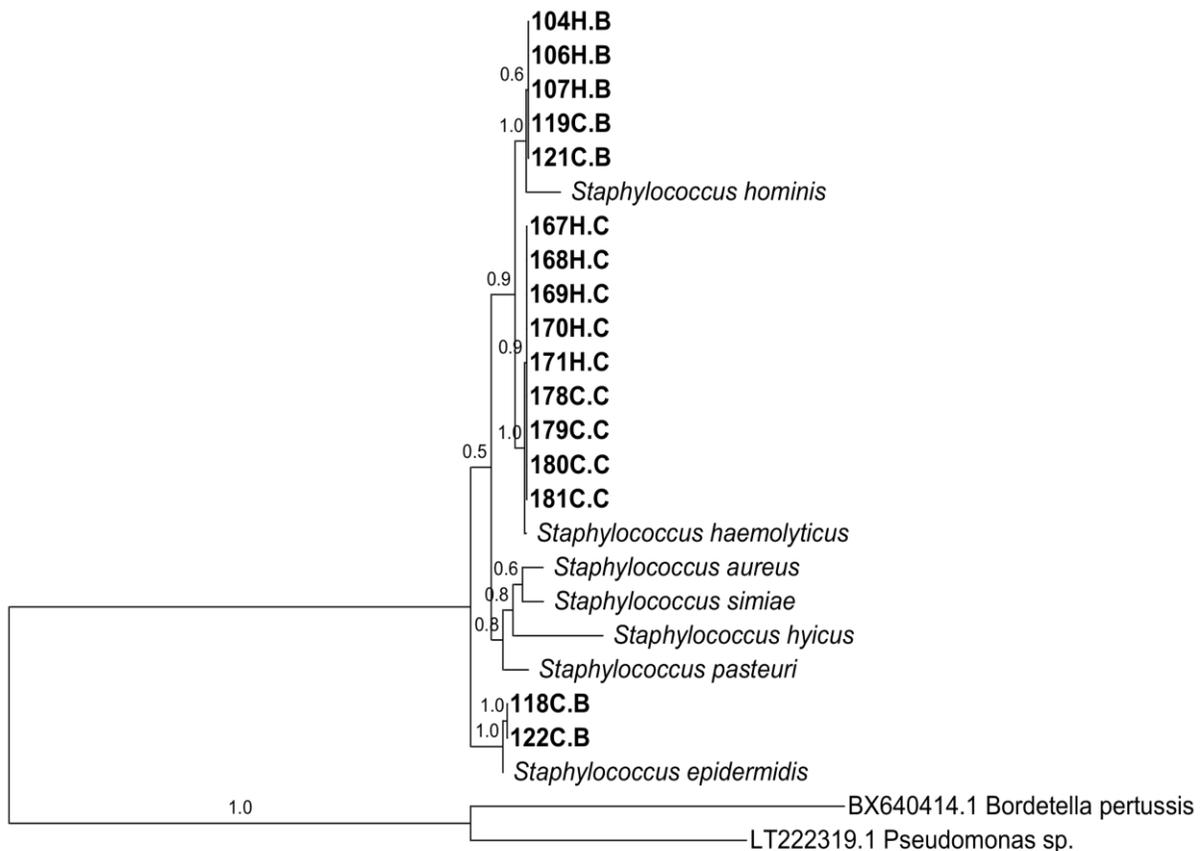


Figura 4. Filograma obtido pela análise bayesiana das sequências concatenadas dos genes *rpoB*, *gap* e *tuf* de isolados *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS). H.B: isolados de mãos de manipulador de queijo tipo Minas frescal da propriedade B; C.B: isolado de queijo da propriedade B; H.C: isolado de mãos de manipulador de queijo da propriedade C; e C.C: isolado de queijo da propriedade C.

A análise de diversidade genética dos isolados por RAPD separou-os em dois grupos, um formado pelas espécies *S. haemolyticus* e *S. hominis*, que são muito semelhantes entre si, inclusive pelo sequenciamento gênico, e outro grupo formado pelos dois isolados *S. epidermidis*. Observou-se no dendrograma que os isolados 107, de mãos de manipuladores de queijo, e 121, de amostras de queijo, ambos da propriedade B, não apresentaram distância genética entre si. Já os isolados 171, de mãos de manipuladores de queijo, e 181, de amostras de queijos, ambos da

propriedade C, encontram-se agrupados no mesmo clado, com distância genética entre si de 0,022, considerada baixa em relação à distância genética dos isolados 167H.C e 180C.C, por exemplo, que é de 0,136, apesar de serem da mesma espécie. Tais resultados são sugestivos de que o próprio ser humano está sendo veículo de disseminação desse importante microrganismo na cadeia de produção de queijos elaborados a partir de leite cru.

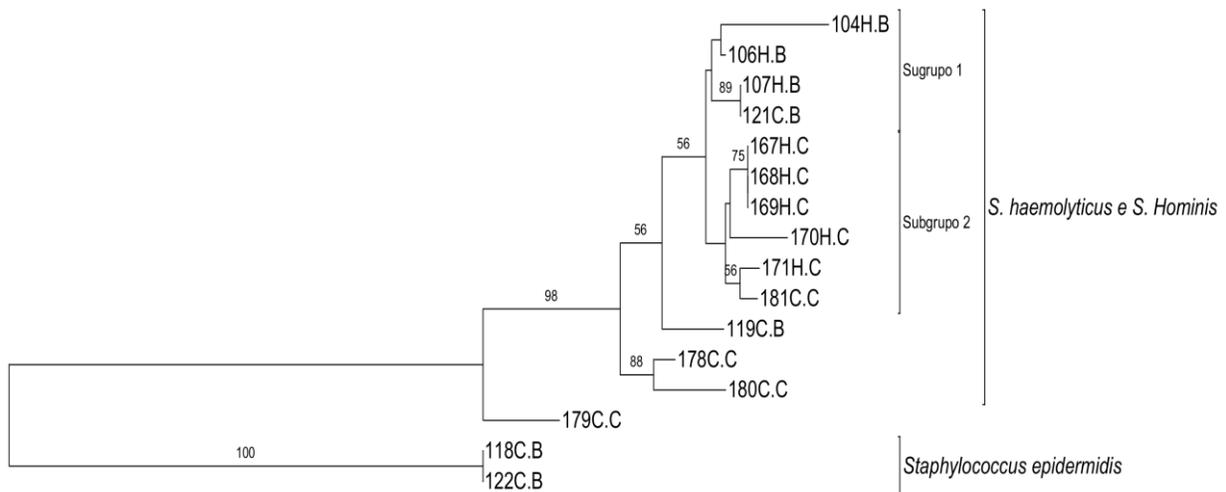


Figura 5. Dendrograma do agrupamento “neighbor-joining” de isolados de MRS de cinco diferentes propriedades leiteiras produtoras de queijo tipo Minas frescal, da região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo. H.B: isolados de mãos de manipulador de queijo da propriedade B; C.B: isolado de queijo da propriedade B; H.C: isolado de mãos de manipulador de queijo da propriedade C; e C.C: isolado de queijo da propriedade C.

Diversos estudos descreveram MRS ou MRSA em alimentos (SHANEHBANDI et al., 2014; RIVA et al., 2015; AL-ASHMAWY et al., 2016), assim como outros descreveram esse importante patógeno em pacientes de hospitais (MOMTAZ; HAFEZI, 2014; TOKAJIAN et al., 2011). Entretanto, nenhum estudo demonstrou alimentos como sendo veículo de disseminação desse microrganismo, infectando, assim, seres humanos. O presente estudo conseguiu demonstrar a contaminação do queijo elaborado

a partir de leite não pasteurizado por mãos de manipuladores, o que poderia ser eliminado com hábitos adequados de higiene. Entretanto, não se descarta a provável contaminação vinda de outras fontes.

É necessário, portanto, um trabalho de educação e saúde para os produtores mostrando a importância e os cuidados durante a higiene e manipulação durante toda a obtenção do leite e produção do queijo, assim como capacitação de mão de obra. Ademais, deve-se aumentar a fiscalização da produção de queijos caseiros elaborados a partir de leite cru, pois ele constitui risco para a saúde pública.

4. CONCLUSÕES

Isolou-se *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina na obtenção do leite e na elaboração de queijos tipo Minas frescal os quais foram resistentes a importantes antimicrobianos usados na saúde humana. Além disso, conclui-se que os seres humanos podem ser fonte de contaminação de MRS, para o leite e seus derivados, o que torna o consumo de queijo Minas frescal de procedência duvidosa um risco à saúde pública.

5. REFERÊNCIAS

AL-ASHMAWY, M.A., SALLAM, K.I., ABD-ELGHANY, S.M., ELHADIDY, M., TAMURA, T. Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy Products. **Foodborne Pathog Dis.** 2016. 13(3):156-62.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research.** Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AQUINO, G. V., MALUTA, R. P., ÁVILA, F. A. Prevalence of methicillin-resistant staphylococci on a farm: Staff can Harbour MRS When Animals Do Not. **Zoonoses and Public Health.** n. 59 p. 1–3, 2012.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility

testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v 45, n.4, p.493-496, 1996.

BERGERON, M., DAUWALDER, O., GOUY, M., FREYDIERE, A.M., BES, M., MEUGNIER, H., BENITO, Y., ETIENNE, J., LINA, G., VANDENESCH, F., BOISSET, S. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 30(3):343-54. 2011.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and highthroughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EUZEBY JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. **Int J Syst Bacteriol**. 47:590–2. 1997

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**. Plainview, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. Hoboken, v. 39, n. 4, p. 783-391, 1985.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. CONSED: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. Plainview, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GORTEL, K., CAMPBELL, K. L., KAKOMA, I., WHITTEM, T., SCHAEFFER, D. J.; WEISIGER, R. M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 12, p. 1526-1530, 1999.

GREEN, P. PHRAP **documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 10 agosto de 2016.

JUHA´SZ-KASZANYITZKY, E´., S. JA´NOSI, P. SOMOGYI, A. DA´N, L. VAN DER G. BLOOIS, E. VAN DUIJKEREN, AND J. A. WAGENAAR,: MRSA Transmission between Cows and Humans. **Emerging Infections Diseases**. v.13, p.630–632, 2007.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. The Williams e Wikins Co, Baltimore, 312p. 1976

MOMTAZ, H., HAFEZI, L. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. **Bosn J Basic Med Sci**. 14(4): 219–226. 2014.

(NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.)

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA, S.G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology** v.117,p. 219-222, 2007.

OPPEGAARD, H., STEINUM, T. M., WASTESON, Y.. Horizontal Transfer of a Multi-Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Environment. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, 2001.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**. v. 26, p. 278-282, 2009.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RIVA, A., BORGHI, E., CIRASOLA, D., COLMEGNA, S., BORGIO, F., AMATO, E., PONTELLO, M.M., MORACE, G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: Prevalence, SCCmec Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. **J Food Prot.** 78(6):1142-6. 2015.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**. Oxford, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Londres: CSHL Press. p.1448. 2001.

SHANEHBANDI, D., BARADARAN, B., SADIGH-ETEGHAD, S., ZARREDAR, H. Occurrence of Methicillin Resistant and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Traditional Cheeses in the North West of Iran. **ISRN Microbiol.** 2014. 2014:129580.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, p. 7, 2010.

SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TOKAJIAN,S., HADDAD,D., ANDRAOS, R., HASHWA, F., ARAJ, G. Toxins and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus Isolated from a Major Hospital in Lebanon. **International Scholarly Research Network ISRN Microbiology**, Vol 2011, Article ID 812049, 9 pages. 2011.

VAN DUIJKEREN, E., A. T. BOX, M. E. HECK, W. J. WANNET, AND A. C. FLUIT, Methicillin- resistant Staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**. n. 103, p. 91–97. 2004.

van RIJEN, M. M. L.; VAN KEULEN, P. H.; Kluytmans, J. A. Increase in a Dutch Hospital of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Related to Animal Farming. **Clinical Infectious Diseases**, 46:261–3, 2008.

VANDERHAEGHEN, W., CERPENTIER, T., ADRIAENSEN, C., VICCA, J., HERMANS, K., BUTAYE, P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, 144, 166e171. 2010.

VICENTE, H. I. G.; **Epidemiologia molecular de cepas de Escherichia coli O157, O111 e O113 produtoras de shigatoxina, isoladas de diferentes tipos de amostras de propriedades leiteiras**. Jaboticabal, 2006.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

WEESE, J. S., T. DACOSTA, L. BUTTON, K. GOTH, M. ETHIER, AND K. BOEHNKE, Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from the environment in a veterinary teaching hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 18, p. 468–470, 2004.

YOON, Y., LEE, S., CHOI, K . Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control** 63, 201-215. 2016.

YUGUEROS, J., TEMPRANO, A., SÁNCHEZ, M., LUENGO, J. M., NAHARRO, G. Identification of Staphylococcus spp. by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of gap Gene. **J Clin Microbiol**. 39(10): 3693–3695. 2001.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa detectou *E. coli* potencialmente patogênica e resistentes a antimicrobianos, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS) em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal nas cinco propriedades amostradas na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Tais contaminações podem estar diretamente associadas às más condições higiênicas sanitárias encontradas nos locais como, não limpeza dos tetos das vacas antes das ordenhas, mesmo quando havia água disponível na sala de ordenha, não realização de teste da caneca de fundo preto e CMT, sujidade de fezes bovinas no ambiente de ordenha, resquícios de leite de ordenhas anteriores nos utensílios e falta de higiene no preparo dos queijos, entre outros. A presença de *S. aureus* em amostras de leite e no produto final pode estar diretamente relacionada à alta percentagem de animais com mastite clínica nas propriedades, observada pela presença de grumos no descarte dos primeiros jatos de leite dos animais. A obtenção de isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos pode estar relacionada ao uso abusivo e/ou inadequado destes medicamentos nas propriedades.

Do ponto de vista da saúde pública, é importante e necessária uma campanha de educação e saúde dirigida aos produtores para conscientização sobre o uso adequado de antimicrobianos e suas consequências, e sobre higiene no processo de obtenção do leite e queijo. O emprego de cuidados tais como limpeza da sala de ordenha, limpeza dos tetos, “pré-dipping”, “pós-dipping” e também testes para mastite clínica como teste da caneca de fundo preto, é imprescindível. Antes, durante e após a produção dos queijos é essencial a limpeza profunda dos utensílios. A utilização de termômetros para mensuração da temperatura do leite e a higiene, principalmente da lavagem correta das mãos, são medidas importantes na produção de queijos tipo Minas frescal, afim de se evitar contaminações entre humanos e alimento. Ademais, deve-se haver controle rigoroso da qualidade microbiológica da água destas propriedades.

A população deve ser conscientizada do risco do consumo do leite cru refrigerado e de queijo tipo Minas frescal produzidos clandestinamente. Tais produtos

não são fiscalizados e podem veicular bactérias patogênicas e resistentes a antimicrobianos que podem ocasionar problemas sérios à saúde humana, podendo colocar em risco a saúde do consumidor. Esta conscientização pode ser iniciada em escolas, por exemplo, para as crianças, que conseqüentemente levarão para os pais.

Além disso, a implantação de fiscalização nas propriedades produtoras de leite e queijo é imprescindível para evitar problemas de saúde pública.