



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E  
ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FELIPE RODRIGUES MAGALHÃES DE AGUIAR**

**PRESENÇA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA (MRSA) EM QUEIJOS DE COALHO PRODUZIDOS NO  
ESTADO DO CEARÁ E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENES DE  
VIRULÊNCIA**

**Fortaleza  
2022**

FELIPE RODRIGUES MAGALHÃES DE AGUIAR

**PRESENÇA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA (MRSA) EM QUEIJOS DE COALHO PRODUZIDOS NO  
ESTADO DO CEARÁ E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENES DE  
VIRULÊNCIA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Linha de Pesquisa:** Biologia para a saúde

**Orientador:** Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes

**Coorientadora:** Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira

**Fortaleza**  
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D32p de Aguiar, Felipe Rodrigues Magalhães.  
Presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em queijos de coalho produzidos no estado do Ceará e seu perfil de resistência e genes de virulência / Felipe Rodrigues Magalhães de Aguiar. – 2022.  
149 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.  
Coorientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.
1. MRSA. 2. Produtos Lácteos. 3. Enterotoxinas. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Meticilina. I. Título.  
CDD 615
-

**FELIPE RODRIGUES MAGALHÃES DE AGUIAR**

**PRESENÇA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA (MRSA) EM QUEIJOS DE COALHO PRODUZIDOS NO  
ESTADO DO CEARÁ E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENES DE  
VIRULÊNCIA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Charllyany Sabino Custódio  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Andréa Bessa Teixeira  
Centro Universitário Fametro – UNIFAMETRO

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosana Serpa  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio  
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, criador de todas as coisas.

À minha família, meu porto seguro.  
À Vovó Sônia, que, infelizmente, não conseguiu realizar o sonho de me ver “doutor”  
em vida, mas que me ilumina do céu.  
Ao Leo.  
Aos meus amigos.  
A todos aqueles que torceram e torcem por mim no dia-a-dia.

## AGRADECIMENTOS

No momento da escrita desta parte da minha tese de doutorado, a aprovação ainda não está concretizada. Ainda não tenho o título de *Doutor em Ciências Farmacêuticas* e a ansiedade pela apresentação deste trabalho ainda me consome.

Isto foi dito para que saibamos que agradecer em momentos de glórias e louros é relativamente fácil. Caso esses agradecimentos estivessem sendo escritos por mim com o diploma no colo, talvez, as palavras fluíssem bem mais tranquilas. Porém, o exercício da gratidão na dificuldade nos arranca do peito (no meu caso, confesso) um sentimento muito mais sincero e corajoso.

E eu posso dizer a você que está com essa tese nas mãos ou na tela de um dispositivo, que, sim, eu sou extremamente grato a todos que, de alguma forma, doaram um pouco do seu tempo para me incentivar, orientar, cobrar, e tantos outros verbos que eu poderia escrever aqui, mas que tinham em comum o objetivo de me fazer sonhar, executar e conseguir.

E, meu Deus, como posso nomear a todos? Que tarefa difícil! Tantos familiares, colegas, amigos e mestres participaram comigo desta jornada. Mas, saibam que todos estão guardadinhos dentro do meu peito que jorra de alegria nesse momento.

Mas, em especial, agradeço ao Léo pelos anos de companheirismo, auxílio e dedicação. Quando eu fraquejava, a sua mão nem titubeava em me colocar de novo em pé e dizer que estava “mais perto do que longe” (mesmo que essa comparação temporal não fosse *tão* verdadeira assim). Eu te amo.

Aos meus pais e ao meu irmão Rafa, que, muitas vezes, abdicaram da minha presença contínua por saberem que eu estava em boas mãos e que esse esforço, um dia, seria recompensado. Saibam, pai e mãe, que o dia da recompensa chegou há bastante tempo, quando eu pude me ver um ser humano capaz **ser** humano e entender que a vida é para ser vivida aqui e agora.

Aos meus queridos familiares, que me dão o prazer diário de ter a família mais família que alguém pode ter. Sim, aquela família longe do comercial de margarina, mas que demonstra sentimentos sinceros sejam quais forem. À Kokoi, Elias e Tia Gláucia, meus mais sinceros agradecimentos pelo alicerce tão profundo que vocês são nas nossas famílias. À Nelsa, minha companheira querida da vida toda e que tem um lugar só dela no meu coração.

Aos meus amigos, pessoas que eu amo tanto e que **convivem** comigo das mais diferentes formas, conjunturas e possibilidades. Obrigado por acreditarem nas minhas

loucuras, compreenderem os meus devaneios e aproveitarem a vida junto comigo. Vocês me proporcionaram experiências inimagináveis e que estarão para sempre comigo.

Aos meus orientadores, Profa. Nádia Accioly e Prof. Ramon Róseo, assim como toda a banca avaliadora da minha qualificação e defesa de tese, professores e funcionários do PPGCF. Vocês fazem parte de um momento bastante esperado na minha vida. Sem vocês, nada disso teria sido realizado. Portanto, muito obrigado.

À minha amada Vovó Sônia, educadora exemplar e de caráter ilibado e excepcional. Doou seus mais sinceros esforços para que eu fosse quem eu sou hoje. De onde a senhora esteja, meu amor, saiba que eu sou fruto da sua dedicação. Todas as conquistas, sejam elas pessoais ou profissionais eu devo à senhora e essa é só mais uma. Sim, eu sei que me ver *doutor* era um sonho diário, mas aqui está ele, se tornando realidade. Obrigado por dar razão e mudar a minha existência nesse mundo.

E, finalmente, no momento em que estamos passando pela maior pandemia em mais de um século, agradeço aos profissionais de saúde e da educação, que jamais se abstiveram e lutaram bravamente para que duas formas de vida não se perdessem: a vida biológica e a vida longe da ignorância.



### **O Analfabeto Político**

O pior analfabeto é o analfabeto político. Ele não ouve, não fala, nem participa dos acontecimentos políticos. Ele não sabe que o custo de vida, o preço do feijão, do peixe, da farinha, do aluguel, do sapato e do remédio dependem das decisões políticas.

O analfabeto político é tão burro que se orgulha e estufa o peito dizendo que odeia a política. Não sabe o imbecil que, da sua ignorância política, nasce a prostituta, o menor abandonado, e o pior de todos os bandidos, que é o político vigarista, pilantra, corrupto e lacaio dos exploradores do povo.

(Bertold Brecht)

**“FORA BOLSONARO!”.**

(Todas as pessoas que ainda têm respeito e amor ao próximo nesse país)

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS DE COALHO PRODUZIDOS NO ESTADO DO CEARÁ: UMA ANÁLISE DO ANIMAL AO PRODUTO FINAL.**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2021.

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo presente na microbiota de humanos e em vários animais de sangue quente. Por causa das atividades agrícolas, esses microrganismos costumam ser transferidos para alimentos, como leite e produtos lácteos, que podem levar a graves doenças transmitidas por alimentos. Durante décadas, vários estudos demonstraram a capacidade desses microrganismos em adquirir resistência aos antimicrobianos, incluindo a meticilina, e, assim, tornarem-se um grande problema de saúde pública. A meticilina, por sua vez, foi a primeira penicilina sintética resistente às penicilinas produzidas por *S. aureus*, torna-se, inclusive, a molécula protótipo do grupo das penicilinas anti-estafilocócicas, que deveria ser plenamente eficaz no combate a esse microrganismo. O presente estudo avaliou a presença de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em 112 amostras de queijos de coalho provenientes de 56 laticínios e fazendas produtoras em 28 cidades de todas as mesorregiões do Estado do Ceará, observando também a presença de genes codificadores de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico e do gene *blaZ* e resistência à meticilina. A pesquisa encontrou 69 cepas de *S. aureus*, 10,14% delas possuidoras do gene *mecA* de resistência à meticilina em queijos de 6 cidades diferentes, sendo a capital do Estado, Fortaleza, possuidora da maior prevalência (57,14%). Também verificou-se que 55,07% das cepas de *S. aureus* possuíam o gene *blaZ* e 7,25% demonstraram resistência à meticilina em testes de disco-difusão em placas. O perfil de resistência mostrou que 14,49% das cepas de *S. aureus* não foram resistentes a nenhum antimicrobiano, enquanto 42,03% mostraram-se resistentes a 3 ou mais fármacos. A maior resistência apresentada foi à eritromicina, seguida por amoxicilina e sulfametoxazol/trimethoprim. O estudo não evidenciou a presença de isolados carreadores de genes toxigênicos através da análise por Multiplex PCR. Estas descobertas demonstram que a supervisão rígida dos processos de produção na indústria de laticínios é necessária desde o estágio de produção, evitando contaminação e possíveis problemas para os consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** MRSA. Produtos lácteos. Enterotoxinas. *Staphylococcus aureus*. Meticilina.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF *RENNET* CHEESES PRODUCED IN THE STATE OF CEARÁ: AN ANALYSIS OF THE ANIMAL TO THE FINAL PRODUCT.

Departament of Toxicology and Clinical Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, 2021.

*Staphylococcus aureus* is a microorganism present in the microbiota of humans and in several warm-blooded animals. Because of agricultural activities, these microorganisms are often transferred to foods, such as milk and dairy products, which can lead to serious foodborne illnesses. For decades, several studies have demonstrated the ability of these microorganisms to acquire resistance to antimicrobials, including methicillin, and thus become a major public health problem. Methicillin, in turn, was the first synthetic penicillin resistant to the penicillinases produced by *S. aureus*, it even becomes the prototype molecule of the group of anti-staphylococcal penicillins, which should be fully effective in combating this microorganism. The present study evaluated the presence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in 112 samples of rennet “coalho” cheese from 56 dairy farms and producing farms in 28 cities in all mesoregions of the State of Ceará, also observing the presence of genes coding for enterotoxins and toxin from toxic shock syndrome, as well as the presence of the *blaZ* gene and resistance to methicillin. The research found 69 strains of *S. aureus*, 10.14% of which possess the methicillin resistance *mecA* gene in cheeses from 6 different cities, the capital of the state, Fortaleza, having the highest prevalence (57.14%). It was also found that 55.07% of the strains of *S. aureus* had the *blaZ* gene and 7.25% demonstrated resistance to methicillin in plate disc diffusion tests. The resistance profile showed that 14.49% of the strains of *S. aureus* were not resistant to any antimicrobial, while 42.03% were resistant to 3 or more drugs. The greatest resistance presented was erythromycin, followed by amoxicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim. The study did not show the presence of isolated carriers of toxigenic genes. These findings demonstrate that strict supervision of production processes in the dairy industry is necessary from the production stage, avoiding contamination and possible problems for consumers.

**Keywords:** MRSA. Dairy products. Enterotoxins. *Staphylococcus aureus*. Methicillin.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência de primers utilizados e os tamanhos dos amplicons em número de pares de bases .....	58
<b>Tabela 2.</b> Número de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas por amostra de queijo, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil .....	63
<b>Tabela 3.</b> Presença do gene <i>mecA</i> em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas por amostras de queijos, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil .....	65
<b>Tabela 4.</b> Número de cepas de <i>S. aureus</i> que possuíam o gene <i>blaZ</i> , isoladas por amostra de queijo, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil.	70
<b>Tabela 5.</b> Número e percentual de cepas de <i>S. aureus</i> positivas para os genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> e <i>blaZ</i> , além de fenotipicamente resistentes à metilina por mesorregião do Estado do Ceará – Brasil. O percentual está relacionado à quantidade total de cepas <i>nuc</i> + (69).....	73
<b>Tabela 6.</b> Perfil de resistência .....	75
<b>Tabela 7.</b> Perfil de resistência das cepas <i>mecA</i> .....	79

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fazenda de criação de gado leiteiro no interior do Estado do Ceará, com o galpão de ordenha no canto superior esquerdo da foto e os animais em momento de alimentação no canto inferior esquerdo da foto .....21
- Figura 2.** Vaca leiteira matriz preparada para o início da ordenha e com o úbere em evidência .....28
- Figura 3.** A) Momento da ordenha em galpão para esse fim, com dois funcionários do laticínio e encanamentos de passagem do leite cru e B) Vaca leiteira com ordenhador automático acoplado às tetas.....41
- Figura 4.** Mapa do Ceará com a distribuição dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de queijos de coalho artesanais.....54
- Figura 5.** Presença de cachorro no estábulo de criação de vacas leiteiras em uma das fazendas visitadas no presente estudo .....66

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição das cepas de <i>S. aureus</i> no Ceará .....	61
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição das cepas MRSA encontradas em amostras de queijo de coalho de acordo com a cidade de produção.....	68
<b>Gráfico 3.</b> Presença do gene blaZ .....	71
<b>Quadro 4.</b> Cepas x antimicrobianos.....	73
<b>Gráfico 5.</b> Perfil de Resistência dos isolados de <i>S. aureus</i> .....	77
<b>Gráfico 6.</b> Perfil de resistência das cepas <i>mecA</i> .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAGRI	Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará
IPECE	Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
LACEN-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidades de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 O leite não humano como alimento.....	15
1.2 A indústria do Leite.....	19
1.3 Criação e saudabilidade dos animais leiteiros e do meio ambiente.....	21
1.4 Queijo de Coalho.....	23
1.4.1 Importância do Queijo de Coalho na Cultura Nordestina.....	23
1.4.2 Qualidade Microbiológica de Produtos Lácteos.....	26
1.5 O gênero <i>Staphylococcus</i> .....	34
1.5.1 Características Gerais e Epidemiologia.....	34
1.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
1.6.1 Contaminação da cadeia do leite por <i>S. aureus</i> .....	40
1.6.2 Resistência antimicrobiana.....	43
1.6.3 MRSA.....	46
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>50</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
3.1 Objetivo geral.....	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>53</b>
4.1 Tipo de estudo e amostragem.....	53
4.2 Etapas do Estudo.....	54
4.3 Isolamento de <i>S. aureus</i> .....	55
4.3.1 Prova da catalase.....	56
4.3.2 Prova da coagulase livre.....	56
4.4 Ensaio genotípicos.....	56
4.4.1 Extração de DNA.....	56
4.4.2 Multiplex PCR.....	57
4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	58
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O leite não humano como alimento

Durante muitos anos a história da utilização do leite de outros animais para a alimentação humana ficou obscura pela falta de metodologias e dados que pudessem comprovar as várias teorias existentes, de quando, onde e como se utilizava essa fonte nutricional. Entretanto, com o advento de tecnologias modernas de avaliação molecular e datação química, muitos desses questionamentos começaram a ter respostas.

Vestígios pré-históricos que rememoram o período neolítico encontrados na Europa trazem diversas informações, inclusive sobre o modelo de alimentação do homem durante sua transição entre a vida nômade e o sedentarismo, onde este construía abrigos mais “elaborados”, iniciava o processo de criação de animais e cultivo de vegetais. Vasos de argila datados de 9.000 a 8.000 a.C., os primeiros desse tipo encontrados, mostraram a presença de “bicos”, por onde líquidos seriam derramados, e resquícios de alimentos contidos nesses recipientes continham uma ampla variedade de ácido graxos, sugerindo que eram utilizados para nutrir lactentes com produtos lácteos derivados de ruminantes (DUNNE *et al.*, 2019).

Evidências também encontradas no continente africano, especificamente na região da África oriental, sugerem a presença de sistemas pastoris especializados datados entre os anos 5.000 e 1.200 a.C., demonstrando o consumo de plantas, carnes e também de leite de ruminantes. É interessante se observar que, até certo ponto, o aumento do consumo de leite e produtos lácteos influenciou diretamente no processo evolutivo humano, pois percebeu-se a persistência da enzima lactase, inclusive no período pós-desmame, a partir dessas populações até chegar no perfil genético relacionado a ela que encontramos nos dias atuais (GRILLO *et al.*, 2020).

Contudo, é de se esperar que o consumo de leite e derivados, comprovado com base nesses estudos moleculares, também traga outras informações importantes sobre a relação história entre o homem e a domesticação de animais para consumo. Esses achados corroboram evidências rupestres encontradas ao norte da Líbia, no deserto do Saara, que mostram que há 7.000 anos já havia naquela região a presença de vacas domesticadas e confinadas para a produção de leite e queijo (ZERBONI;

NICOLL, 2018). No Iraque, obras históricas de, aproximadamente, 5.100 anos mostram figuras de gado confinado e “gordo” além de cenas típicas da produção de leite e derivados, como manteiga, incluindo a ordenha da vaca, a coação e a produção do derivado (GADD, 1932).

Segundo Lowe (1938), apesar de o leite de vaca, ovelha e cabra fossem os mais consumidos durante a pré-história e até à época atual, há registros de outros animais que também eram utilizados para essa produção, inclusive mula e égua, citada pelo filósofo romano Marcus Terentius Varro (116 a.C. – 27 a.C.) como produtora de leite com propriedades laxativas. O leite de égua, é, inclusive, utilizado há muito tempo para a produção de uma bebida alcoólica fermentada chamada *kumis*, apreciada na região da Ásia central e que também pode ser obtida por meio da acidificação do leite de mula e de camela (GRIEVE, 1789; CLARKE, 1811).

Varro (1912), em sua obra *Rerum Rusticarum*, descreve e classifica os queijos, produzidos a partir de leite de ordenha, a partir de seu local de produção e sua origem, dizendo que *“os queijos mais nutritivos, pelo menos digeríveis, são os de vaca; em seguida os das ovelhas, e menos nutritivos, mas mais leves no estômago, são os das cabras. Além disso, existe uma diferença que depende se o queijo é macio e fresco ou seco e envelhecido: o primeiro é mais nutritivo e é facilmente suportado na digestão do que o outro”* (VARRO, 1912).

Virgílio (*Publius Vergilius Maro*, 70 a.C. – 21 a.C.), poeta clássico romano, demonstra em uma de suas obras a importância do queijo para a alimentação àquela época, dizendo que *“o que se ordenha pela manhã, ao largo do dia se prensa e pela noite se converte em requeijão; o que se ordenha de madrugada, se elabora na primeira hora da manhã e o pastor o leva a cidade na cesta de queijo. Ou se deixa salgar um pouco e se guarda para o inverno”*. É a clara demonstração de que a fermentação do leite para a produção de queijo teve papel fundamental para o armazenamento do produto, antes, extremamente perecível (VIRGÍLIO, 1825).

É interessante compreender que a evolução da utilização do leite não é somente com a finalidade nutricional, mas, engloba também a utilização de seus derivados fermentados para o tratamento de enfermos (DUNNE *et al.*, 2019). O que conhecemos atualmente como produtos lácteos probióticos têm indícios de utilização próximo ao ano 2000 a.C., a partir da descoberta do homem de como conservar o leite, já que, anteriormente, o consumo era *in natura* em decorrência da sua perecibilidade. Os primeiros produtores desses alimentos, que depois seriam

chamados de laticínios, utilizavam leveduras e bactérias para provocarem a acidificação do leite, mesmo sem conhecerem a existência de tais microrganismos (NAKAZAWA; HOSONO, 1992; OZEN; DINLEYICE, 2015).

Com a revolução industrial e o avanço tecnológico pós-idade média, novas metodologias para a conservação do leite e seus derivados e para diminuir o risco de contração de doenças por meio da alimentação foram surgindo, como a pasteurização. Em 1900, Russell e Hastings descreveram os pontos de morte através da pasteurização para a eliminação do bacilo da tuberculose, comumente presente no gado leiteiro e causador de uma das doenças mais temidas da época. Segundo eles, o aquecimento do leite e do seu creme por 15 a 20 minutos a 60 °C melhoraria muito a qualidade microbiológica do leite sem afetar suas características organolépticas, incluindo a destruição também dos microrganismos da difteria (*Corynebacterium diphtheriae*) e febre tifoide (*Salmonella typhi*).

No Brasil, a pecuária leiteira iniciou-se trinta e dois anos após o descobrimento, quando Martim Afonso de Souza trouxe da capital para a então colônia portuguesa trinta e duas cabeças de gado entre bois e vacas, que desembarcaram na cidade de São Vicente, de acordo com historiadores. Entretanto, o registro oficial da atividade somente ocorreu em 1641, por meio de uma pintura em que se vê a ordenha de uma vaca na antiga capitania de Pernambuco, próximo à cidade do Recife (DIAS, 2012).

Dias (2012) relata também que durante quase 400 anos o leite era um produto secundário na colônia, com poucas vacas mantidas com finalidade leiteira, exceto em pequenas propriedades rurais no interior do país. Isso trouxe como consequência a falta de hábito de consumo de leite e derivados pela população brasileira até meados do século XX. Além disso, o leite brasileiro somente começou a receber algum tipo de tratamento no pós-década de 1950, tendo sido transmissor de doenças por todos os séculos anteriores, o que diminuía ainda mais o consumo.

A década de 1930 ocasionou situações importantes para o estímulo do consumo de leite no país: em 1931, uma peça publicitária que trazia um jovem esportista com uma garrafa de leite e os dizeres “Beba mais leite!” estavam presente nas páginas dos maiores jornais que circulavam pelo Brasil. Frases impressas em negrito com várias frases como “O leite encerra a vitamina”, “O leite faz de um fraco um forte”, “O leite dá bom humor”, “Leite: bebei e multiplicai-vos” tentavam convencer o leitor de que o produto deveria ser considerado um alimento básico (JORNAL DO BRASIL, 1933a; JORNAL DO BRASIL, 1933b; JORNAL DO BRASIL, 1933c).

Em 1936, um importante estímulo ao consumo de leite no Brasil veio de um nordestino, o pernambucano Dr. Josué de Castro, que realizou um estudo com 500 famílias de trabalhadores no Recife e demonstrou que o padrão de alimentação com base no consumo de charque, feijão e mandioca era insuficiente para a manutenção nutricional saudável, tanto em relação ao componente calórico quanto a vitaminas e minerais. Para ele, o leite era rico em todos esses componentes e recomendou ao governo do estado de Pernambuco que incluísse esse alimento na dieta diária da população (CASTRO, 1936).

Com isso, em 1940, o Presidente Getúlio Vargas providenciou, por meio do Decreto-Lei nº 2.384, de 10 de julho de 1940, a criação uma Comissão Executiva para promover, organizar e executar, diretamente, o fornecimento de leite para a capital, Rio de Janeiro, que consideraria a *“necessidade de fornecer ao consumidor do Distrito Federal leite puro, atendendo não só às necessidades alimentares, como ainda aos requisitos de absoluta higiene e sanidade e a conveniência de um reajustamento entre os preços pagos ao produtor e cobrados ao consumidor”*. Esse decreto visava nacionalizar as empresas de laticínios que estavam estabelecidas no país e formar cooperativas de produtores (BRASIL, 1940).

A preocupação com a qualidade microbiológica e sanitária do leite foi trazida às políticas de Estado em 1952, também no governo Vargas, com a publicação do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o então novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. No capítulo II deste decreto, que trata especificamente do leite, os estabelecimentos produtores foram distribuídos em: I – Propriedades Rurais (produtores de leite); II – Postos de Leite e Derivados; e III – Estabelecimento Industriais, além de classificar o leite de acordo com a sua origem: tipo “A” para os produzidos em “granjas leiteiras”, tipo “B” para os produzidos em “estábulo leiteiros” e tipo “C” para os produzidos em “fazendas leiteira”. É importante salientar que esse decreto também relaciona os tipos de leite com a presença ou ausência de processamentos como a pasteurização (BRASIL, 1952).

Sendo assim, com o advento da pasteurização citada anteriormente, método de diminuição de microrganismos patógenos em leite e derivados, a expansão da indústria láctea foi inevitável. Houve um substancial aumento na demanda de queijo e manteiga nas áreas urbanas, distantes da região rural produtora, e a ordenha familiar, com pequenos produtores que dependiam da família para a criação dos animais foi

substituída pela mecanização do processo, liderada pela máquina de ordenha, além da melhoria do transporte, da eletrificação das propriedades e da própria pasteurização. Com isso, as antigas fazendas de subsistência deram lugar a grandes espaços pecuários que ampliaram a distribuição geográfica da pecuária leiteira (MCGUFFEY; SHIRLEY, 2011).

Estas evidências demonstram a importância que o leite de animais domesticados possui desde a pré-história na alimentação de enfermos e no desmame de bebês para essas comunidades, perpassando pela Idade Média e Moderna, com evolução no processo produtivo, inclusive relacionado às questões sanitárias, tendo na pasteurização um modelo de sucesso para a eliminação de patógenos.

## **1.2 A indústria do Leite**

Em todo o mundo e há muitos anos a indústria do leite vem se mostrando um dos pilares da economia agropecuária. Em decorrência da diversidade de produtos derivados que podem ser produzidos, inclusive em larga escala, esta atividade econômica tem papel fundamental desde a manutenção da estabilidade econômica de muitos países até a promoção da subsistência de milhões de famílias de pequenos produtores. Sabe-se que o motivo de essa área econômica estar em constante desenvolvimento e ser altamente competitiva tem relação com às altas intervenções governamentais nesse setor e em decorrência do alto consumo desses produtos ao redor do mundo (FRANCO; NAGRALE, 2020).

Contudo, a indústria láctea tem características que a diferenciam de várias outras, pois se trata de um setor que produz durante todo o ano, dependente da criação pecuária para sua produção e ordenha, além de o leite tratar-se de um produto altamente perecível que precisa ser transportado todos os dias de uma forma bastante onerosa ao produtor, exceto quando transportado sob a forma de pó, condensado ou como queijo. Essas características contrastam com o principal tipo de produtor: agricultores e pequenos pecuaristas que, muitas vezes, possuem vulnerabilidade econômica dentro deste mercado (DOUPHRATE *et al.*, 2013).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os maiores produtores mundiais de leite incluem países e blocos considerados desenvolvidos e em desenvolvimento, como a União Europeia, Índia, Estados Unidos e Brasil, tendo, este último, ocupado a sétima posição entre os

maiores produtores no ano de 2016 e estima-se que ultrapasse a Rússia e se torne o sexto produtor mundial até o ano de 2025 (OECD/FAO, 2021).

A posição brasileira dentro deste mercado está intimamente ligada à nossa cultura e às nossas tradições, tendo os pequenos produtores rurais papel fundamental na disseminação de tais produtos na mesa dos consumidores brasileiros. Por todo o país, mais de dois milhões e quinhentos mil estabelecimentos criavam gado e, destes, mais de um milhão cento e setenta mil produziram leite de vaca, sendo novecentos e cinquenta e cinco mil pequenos produtores incluídos em programas de agricultura familiar (BRASIL, 2017).

Isso é reflexo das mudanças consideráveis que essa cadeia produtiva em sofrendo no Brasil nos últimos 50 anos: produção em crescimento sistemático, novas tecnologias sendo incorporadas à produção, aumento da força de trabalho, aumento da área produtiva e incremento da produtividade levando em consideração a eficiência e a sustentabilidade. Depois de pequenas quedas de consumo em decorrência da perda de poder de compra das famílias em decorrência de crises econômicas, o mercado vem reaquecendo e o nível de consumo vem apresentando uma tendência de alta entre as famílias brasileiras (VILELA *et al.*, 2017).

Entretanto, deve-se considerar também que não somente a queda no poder de compra das famílias foi importante em diminuições ou modificações relativas ao consumo de leite. A maior preocupação com a higiene e com a qualidade sanitária dos produtos, aliada às novas fontes de informação disponíveis aos consumidores fez com que muitas pessoas substituíssem o leite proveniente de pequenos produtores (que possuíam menores capacidades de controle de qualidade) por leites pasteurizados ou de grandes indústrias, além de favorecerem a migração do consumo do leite cru para seus derivados, como o queijo (BASANISI *et al.*, 2017; VILELA *et al.*, 2017).

A vastidão do território e a multiculturalidade da população brasileira faz com que a diversificação relacionada a esse mercado abranja muitos fatores do setor produtivo. Percebe-se que no país há uma variação de produtores que vai desde grades conglomerados, com alcance mundial por meio de exportações, até aqueles pequenos produtores, que atendem às demandas de uma só comunidade, geralmente circunvizinha ao estabelecimento. Estes pequenos produtores, muitas vezes, preferem fazer parte do mercado de queijos frescos ou de média maturação, pois são os que demandam uma menor necessidade de investimento em equipamentos,

tecnologias de produção, além de um menor capital de giro ser necessário, já que não passam muito tempo maturando até serem comercializados, como acontece com os queijos de alta maturação (LIMA; PEREZ, CHAVES, 2017).

### 1.3 Criação e saudabilidade dos animais leiteiros e do meio ambiente

As fazendas leiteiras compõem uma grande fonte de renda para muitos brasileiros e têm um importante papel na economia local e nacional. A heterogeneidade destas tem relação com a variação da escala de produção, sofisticação tecnológica e características da força de trabalho, implicando diretamente com os operadores agrícolas, que enfrentam diferentes desafios e que as propriedades têm desempenhos econômicos, sociais e ambientais diferentes (BÁNKUTI *et al.*, 2018).

Na busca de um desempenho promissor, um dos principais fatores que deve ser levado em consideração é o bem-estar animal. Animais que convivem em um ambiente saudável e confortável podem aumentar a produtividade e a expressividade de suas potencialidades genéticas. Esse bem-estar deve ser preservado em todas as fases da criação, do nascimento à morte, contribuindo também na diminuição de problemas de saúde, como infecções e estresse. (KRUEGER *et al.*, 2020).

**Figura 1.** Fazenda de criação de gado leiteiro no interior do Estado do Ceará, com o galpão de ordenha no canto superior esquerdo da foto e os animais em momento de alimentação no canto inferior esquerdo da foto.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O estresse animal, inclusive, é o principal interferente no bem-estar nas fazendas leiteiras. Temperaturas altas ou baixas demais diminuem a alimentação dos animais e, com isso, a produção de leite pode apresentar queda considerável, além disso, também interferem nos processos reprodutivos e contribui fortemente com a mortalidade e a presença de mastite, uma inflamação da teta e do úbere que pode ser provocada por infecções no animal (DALTRO *et al.*, 2020).

Ainda segundo Daltro (*et al.*, 2000), como cerca de 65% do Brasil está situado na região tropical do planeta, as altas temperaturas e a incidência de radiação solar são um desafio para os produtores brasileiros, principalmente no Nordeste, podendo gerar perdas econômicas e interferir na saúde dos animais. Porém, a utilização de algumas técnicas pode ajudar a reduzir esse estresse térmico, como o sombreamento natural e artificial, dieta com menor incremento calórico e utilização de sistemas como ventilador, aspersor e painel evaporativo, que auxiliaram no conforto dos animais.

A manutenção do bem-estar animal, através de boas práticas de manejo, tem impacto direto na economia da fazenda produtora, já que estudos demonstram que há uma diminuição dos custos com cuidados veterinários e da mortalidade das bezerras, assim como boas práticas de manejo e de higiene melhoram a lactação, reduzem o leite residual (não comercial) e diminuem a presença de mastite, que pode levar microrganismos patogênicos ao leite e estimular a utilização irracional de medicamentos antimicrobianos (COSTA; CEBALLOS, 2021). É importante salientar que a utilização de medicamentos no gado promove a liberação ambiental de resíduos e contaminantes do solo.

Sendo os impactos ambientais relacionados à pecuária bem estabelecidos em todo o mundo, inclusive no Brasil, modelos de produção que levem em consideração a sustentabilidade estão sendo cada vez mais exigidos pelas esferas governamentais e pelos consumidores, que têm dado preferência aos produtos ecologicamente corretos em detrimento daqueles que ainda possuem um perfil de degradação ambiental considerável. Essas exigências vem provocando o abandono de muitos pecuaristas à cultura leiteira em todo o Brasil<sup>1</sup>.

Deve-se saber também que dentro das ações consideradas sustentáveis, há a responsabilidade ambiental, que por diversas vezes é maculada com a utilização de compostos químicos e farmacológicos de maneira irracional, seja na agricultura ou na

---

<sup>1</sup> BRASIL, Censo **Agropecuário 2017**. Resultados Definitivos. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. - <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6912#resultado>>. Acesso em: 23/03/2021.



pecuária, sendo, esta última, com a finalidade de aumentar a produção ou combater doenças no rebanho, como as mastites causadas por *Staphylococcus* spp. (GEORGAKAKOS; HICKS; WALTER, 2021).

Contudo, a utilização irracional pode causar diversos problemas relacionados ao meio ambiente, como citado anteriormente, e também à produção dos alimentos nesses ambientes. Muitos antimicrobianos, por exemplo, são mal absorvidos após a administração veterinária, o que leva a uma excreção a taxas que variam de 50% a 90% desses compostos, a depender do tipo de antimicrobiano. Esses resíduos de antimicrobianos no solo podem levar a uma pressão seletiva sobre microrganismos resistentes e desencadear a disseminação destes para os outros animais e/ou produtos produzidos (KIM *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2018).

Ressalta-se que quando se trata de procedimentos relacionados à saúde animal, especificamente à utilização de insumos farmacológicos, há uma significativa diferença em comparação aos seres humanos: as fezes animais não sofrem nenhum tipo de tratamento de esgoto, o que aumenta consideravelmente a presença desses insumos inalterados (ou seus resíduos) no solo (KIM *et al.*, 2011).

Geralmente, a realidade que se mostra em relação à sustentabilidade em fazendas leiteiras no Brasil é que os grandes produtores, com alta produtividade e grandes rebanhos apresentam maiores índices de ações sustentáveis em comparação àqueles pequenos, que possuem baixa escala de produção e, conseqüentemente, menor capacidade de investimento (BÁNKUTI *et al.*, 2018).

## **1.4 Queijo de Coalho**

### **1.4.1 Importância do Queijo de Coalho na Cultura Nordestina**

O queijo de coalho é um alimento lácteo tipicamente consumido na região Nordeste do Brasil, obtido por meio da coagulação do leite pelo coalho ou outras enzimas coagulantes, com ou sem a presença de bactérias lácticas apropriadas, de média a alta umidade e com teor de gordura variando entre 35 a 60% de sua massa sólida e sua produção, geralmente, se dá em pequenas e médias propriedades rurais, pertencentes aos próprios produtores de leite, com baixo uso de tecnologias e rebanhos com poucos animais

Segundo Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, o queijo de coalho é aquele que “se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação” (BRASIL, 2001).

É um produto costumeiramente utilizado nas casas brasileiras, em especial as nordestinas, de onde faz parte da cultura culinária há muitos séculos. Henry Koster (1784-1820), um cronista nascido em Lisboa que percorreu o Nordeste brasileiro, escreveu em uma de suas obras sobre o queijo para a cultura nordestina da seguinte forma:

O queijo do Sertão é excelente quando fresco mas ao fim de quatro ou cinco semanas fica duro e coriáceo. Poucas pessoas fabricam manteiga, batendo o leite em garrafas comuns. (KOSTER, 1942).

Os escritos de Henry Koster mostram que o queijo curtido ou curado era levado pelos sertanejos nordestinos nas distantes e longas viagens que faziam desde o século XVII e era um alimento bastante consumido juntamente com a farinha, a carne seca e rapadura, para que os viajantes tivessem a energia necessária para tanger o gado até as cidades onde seria comercializado. Além disso, o queijo de coalho também era utilizado como moeda de troca, onde por meio do escambo, o produtor recebia de volta outros alimentos que a família necessitava (ABREU, 1988).

Essa associação histórica entre a produção de queijo de coalho e a cultura nordestina passa, inclusive, pelo século XIX, com a criação bovina no interior da região e as charqueadas, estando relacionada à cultura de subsistência, na qual toda a família e os parentes próximos tinham acesso ao queijo e à manteiga produzidos a partir da sobra do leite. Fatos históricos como esse transformaram o queijo de coalho em um patrimônio (ainda não oficial) da população nordestina (MENEZES, 2011).

Rachel de Queiroz (1910-2003), escritora cearense reconhecida internacionalmente por suas obras voltadas à sociedade nordestina, relembrou sua infância em uma das fazendas de sua família falando sobre o queijo de coalho:

Em fazendas como a Califórnia, o Junco e outras, o mais importante como componente alimentar eram os queijos. Basicamente, o queijo de Coalho, salgado, feito em formas e prensa de madeira. Quem conseguia ser o encarregado de apertar o queijo no cincho era sempre o vencedor de uma

espécie de batalha campal entre irmãos e primos. Esse vitorioso adquiria o direito de comer as deliciosas aparas do queijo que, confesso, ainda recordo com água na boca” (QUEIROZ, 2000).

A importância do queijo de coalho nas mesas brasileiras é incontestável. Porém, são nos lares nordestinos que o produto é mais apreciado. Soares (*et al.*, 2017) questionaram consumidores das regiões Nordeste e Sudeste sobre o queijo coalho e o Nordeste foi responsável por elencar as maiores qualidades de sabor a ele, com mais do que o dobro de menções positivas feitas por consumidores do Sudeste. Além disso, os nordestinos veem no queijo de coalho uma fonte nutricionalmente saudável de cálcio.

No Estado do Ceará, de acordo com o Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE), todos os municípios têm produção leiteira que serve de matéria-prima para a produção de diversos produtos lácteos, como iogurte, bebidas lácteas, manteiga e queijo. A concentração de produtores se dá, principalmente, nas regiões do Sertão Central e Jaguaribe, e é considerada uma atividade econômica relevante para todo o Estado (IPECE, 2018).

Para a produção artesanal do queijo de coalho, os produtores utilizam o leite, preferencialmente, recém-ordenhado e em uma temperatura próxima dos 35 °C. Então, o coalho é adicionado e fica em repouso por cerca de 60 minutos, para a formação do que o sertanejo chama de coalhada. A coalhada é uma massa semissólida que é cortada em cubos pelo produtor e levada ao fogo para um pré-cozimento a uma temperatura de 85 °C. Após esse processo, a coalhada é salgada e posta em um recipiente para a prensagem, que leva entre 4 e 8 horas. Após esse período, o queijo está pronto.

Para sua produção, o queijo de coalho pode ter como substrato o leite de diversos animais, porém, os mais comuns são o de vaca e de cabra, animais bastante criados em fazendas no nordeste do Brasil. Atualmente, ainda é feito em muitas queijarias e laticínios de pequeno porte de forma tradicional, artesanal, com conhecimentos que foram passados de geração em geração e que servem como fonte de renda para várias famílias sertanejas (SANTOS *et al.*, 2019).

Essa fonte de renda é estrutural e socialmente fácil de ser compreendida, já que o queijo de coalho é considerado um alimento em que a técnica é “aprendida no olhar”, ou seja, em que as crianças que nascem e crescem em ambientes queijeiros tendem a seguir essa tradição. A realidade das queijarias nordestinas mostra isso:

várias pessoas da mesma família trabalhando juntas na produção durante mais de trinta anos, com a predominância de homens de meia-idade. Porém, um fato interessante é que a comercialização, que antigamente se dava na região circunvizinha e, atualmente, é feita, principalmente, nas capitais e maiores cidades de cada estado (MENEZES, 2011; BASTOS; ULISSES; FONTENELE, 2013).

A falta de investimento em educação dos produtores também é um ponto perceptível nesse tipo de fonte de renda. Estudos demonstram que mais de 60% dos funcionários desses estabelecimentos não possuem nível médio completo, o que contribui não somente para a não adesão a práticas de produção que aumentem a produtividade e a competitividade, mas também para a falta de seguimento de boas práticas higiênico-sanitárias de fabricação dos produtos. Por este motivo, muitos consumidores ainda veem (algumas vezes, assertivamente) o queijo de coalho artesanal como um vetor importante de doenças alimentares (SOARES *et al.*, 2017; SANTOS, 2019).

#### 1.4.2 Qualidade Microbiológica de Produtos Lácteos

Há, em todo o mundo, mais de 200 tipos diferentes de doenças causadas em decorrência da ingestão de alimentos contaminados com bactérias, vírus, fungos, parasitas ou substâncias químicas. Esse número extremamente alto é responsável também por acometer uma em cada dez pessoas de alguma doença pós-consumo alimentar, causando mais de quatrocentos e vinte mil mortes, principalmente de crianças com menos de 5 anos (WHO, 2021).

No último estudo publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em que os 31 maiores causadores de doenças alimentares foram estudados, o número de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) chegou à marca de seiscentos milhões por ano, tendo as doenças diarreicas o protagonismo desses números, causadas por norovírus, *Campylobacter* spp., *Salmonella enteritidis*, dentre outras (WHO, 2015).

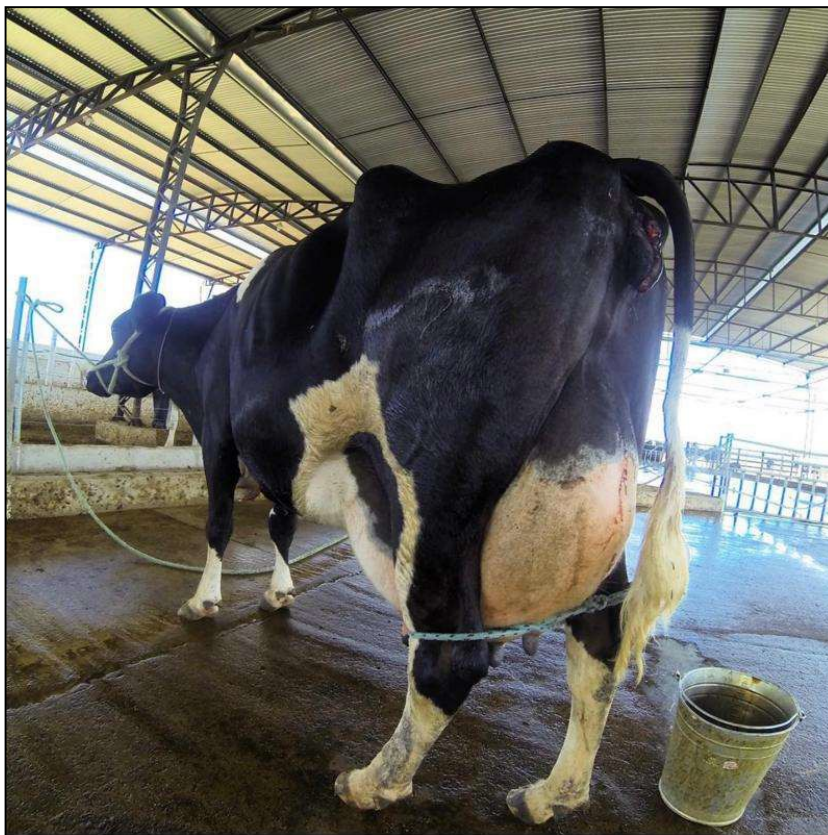
No Brasil, problemas relacionados aos alimentos também são causas importantes de morbidade e mortalidade, com surtos sendo registrados todos os anos em diversas regiões do país, causados por agentes também diversos, assim como os alimentos comprometidos. Casos de alimentos contaminados e causando DTA já foram registrados em decorrência da presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.,

*Bacillus cereus* (BESSA *et al.*, 2020), rotavírus, norovírus, além de *Clostridium botulinum*, causador de uma das mais graves doenças de origem alimentar, o botulismo (FINGER *et al.*, 2019). O *Clostridium botulinum*, inclusive, é suspeito de ter causado botulismo em 2019, no Brasil, em decorrência do consumo de cereais (WHO; FAO, 2020).

Dentre os alimentos conhecidamente envolvidos na transmissão de DTA, o leite possui lugar de destaque. Suas ricas características nutricionais fazem do leite e de seus derivados um ambiente extremamente convidativo para o crescimento e a reprodução microbiana, além de possuir alta atividade de água (*aw*), necessária para a sobrevivência da maioria dos microrganismos. É um alimento rico em lactose, seu principal carboidrato, além de proteínas, como a caseína, aminoácidos essenciais, lipídios, minerais e vitaminas. Por esse motivo, entre 2015 e 2019, o leite e seus derivados foram o grupo alimentar mais relacionado a eventos de segurança alimentar entre 23 grupos estudados (MARTIN *et al.*, 2018; WHO; FAO, 2020).

Entretanto, não há como avaliar a qualidade do leite sem conhecer a fisiologia e a microbiota do animal produtor, assim como o seu método de extração e produção de derivados. Em vacas pré-púberes, ou seja, que ainda não pariram e nem começam a lactação, o úbere (Figura 2) e o interior da glândula mamária são considerados ambientes estéreis. Porém, após a abertura do canal que liga a glândula mamária ao ambiente no momento da ordenha ou da mamada do bezerro, os microrganismos têm acesso a esses ambientes e os colonizam (TAPONEN *et al.*, 2019).

**Figura 2.** Vaca leiteira matriz preparada para o início da ordenha e com o úbere em evidência.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Anteriormente, os trabalhos que avaliavam a qualidade microbiológica do leite e de seus derivados tinham a concepção de que a microbiota encontrada era advinda exclusivamente de fatores extrínsecos como contaminação pelo produtor, microrganismos da pele do animal, dos tanques de armazenamento ou da própria cavidade oral do bezerro (FEßLER *et al.*, 2012; ASIIMWE *et al.*, 2017). Porém, agora sabe-se que a transmissão endógena também pode acontecer, como por exemplo, bactérias presentes lúmen intestinal dos animais utilizarem linfonodos mesentéricos para deslocarem-se até as glândulas mamárias (YOUNG *et al.*, 2015; ADDIS *et al.*, 2016).

A microbiota do leite é diversa e heterogênea, com um enorme grupo de microrganismos podendo estar presentes em amostras desse alimento. Em vacas, bactérias dos gêneros *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dentre outras (YOUNG *et al.*, 2015; ADDIS *et al.*, 2016). Já no leite de cabras, a presença de bactérias dos gêneros *Novosphingobium*, *Brachybacterium*,

*Psychrobacter*, *Lactobacillus*, dentre outras, é comumente encontrada e não causa problemas relacionados à saúde, exceto em pessoas sensíveis ou com a imunidade comprometida (NIYAZBEKOVA *et al.*, 2020).

Apesar de não estarem relacionados à problemas de saúde, muitos desses microrganismos podem ser considerados microrganismos deteriorantes, que trazem prejuízos econômicos quando se multiplicam de forma indiscriminada. O leite, ao permanecer em temperaturas favoráveis ao crescimento microbiano, estimula a multiplicação de bactérias acidoláticas, como *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp., que produzem ácido lático de forma descontrolada a partir do seu metabolismo e “azedam” o leite, caracterizando a perda do produto e sua inutilização para a produção de derivados (ZHANG *et al.*, 2019). Entretanto, quando esse processo de “azedar” é feito de forma controlada, teremos vários produtos derivados com vida útil maiores do que a do leite em si.

A presença desses microrganismos considerados não patogênicos no leite representa uma vantagem para a prevenção de DTA por esse alimento, já que esses microrganismos competem com as bactérias patogênicas e regulam seu possível crescimento. Inclusive, a presença de bactérias patogênicas ressalta a importância do controle de qualidade rigoroso que o leite deve passar, desde o momento da criação dos animais, passando pela ordenha, armazenamento e transporte até o momento em que será utilizado para a produção de seus derivados. Esse leite, que ainda não passou por nenhum processamento, é chamado de “leite cru” e possui grande impacto na qualidade do produto final (ADDIS *et al.*, 2016; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018).

Um ponto crítico em toda a cadeia do leite é a temperatura, que deve ser extremamente controlada durante todo o processo. A temperatura, inclusive, é o método fundamental da tecnologia mais utilizada para o processamento do leite: a pasteurização. A pasteurização é um processo que consiste no tratamento térmico do leite em temperaturas um pouco inferiores ao seu ponto de ebulição durante um determinado tempo e, após, resfriá-lo (RUSSELL; HASTINGS, 1900). Essa técnica foi aperfeiçoada ao longo dos anos, porém, seu princípio continua igual.

Na pasteurização, muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos são destruídos pela temperatura mais alta e o leite se mantém com viável para o consumo por muito mais tempo após esse processamento, já que, logo após, é armazenado em temperaturas mais baixas, que evitam o crescimento microbiano (RUSSELL; HASTINGS, 1900; MARTIN *et al.*, 2018).

Entretanto, mesmo após a pasteurização, a qualidade microbiológica do leite ainda deve ser monitorada de forma rigorosa, pois, a contaminação ainda é problemática para a indústria do leite mesmo nesse momento. Bactérias psicrotróficas, que suportam temperaturas mais baixas, se reproduzem em condições de armazenamento e podem causar problemas de saúde após o consumo de produtos lácteos pasteurizados (VON NEUBECK *et al.*, 2015).

As principais bactérias psicrotróficas contaminantes do leite pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Essas bactérias, juntamente com bactérias esporuladas, podem produzir várias enzimas importantes nos processos de degradação do leite, como lipases e proteases, responsáveis por mudarem características organolépticas como odor e sabor, além de também estimularem o processo de coagulação do leite, que pode acontecer pela produção de ácidos ou por proteólise, gerando uma espécie de “coalhada azeda” (von NEUBECK *et al.*, 2015; MENG *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2018).

A contaminação do leite, como dito anteriormente, pode ser proveniente de inúmeros locais, seja de forma endógena ou exógena. Os microrganismos patogênicos podem chegar ao leite através da ração utilizada para alimentar os animais, a água, o ar ambiente, o pasto, o local de descanso e dormida dos animais e, também, se houver manuseio sem medidas eficazes de controle microbiológico (CARFORA *et al.*, 2016; CARUSO *et al.*, 2016; BASANISI *et al.*, 2017).

Muitos microrganismos conhecidamente patogênicos podem estar presentes no leite e o contaminarem em qualquer uma das etapas da cadeia produtiva. Dentre eles, alguns se destacam, como *Brucella melitensis*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produtora de shiga-toxina bactérias do gênero *Staphylococcus* (BESSA *et al.*, 2020; BROM *et al.*, 2020). Atualmente, a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos comercializados e produzidos no Brasil, porém, quando se trata de leite e alimentos derivados, dentre os microrganismos citados acima, somente *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivos possuem esses padrões (BRASIL, 2019).

Embora a *E. coli* seja uma bactéria comensal do intestino humano saudável assim como de outros mamíferos, algumas cepas desse microrganismo podem ser altamente virulentos e causarem doenças graves e, até fatais, como a cepa produtora de shiga-toxina (STEC), que provoca diarreia sanguinolenta e pode levar o paciente à



síndrome hemolítica urêmica (GUERRA *et al.*, 2020). Em pacientes pediátricos, essa síndrome gera consequências mais problemáticas e aparece em cerca de 5 a 15% dos pacientes que adquiriram essa cepa por meio da ingestão de alimentos contaminados, incluindo os de origem láctea (BRUYAND *et al.*, 2019).

A produção de toxinas do tipo *Stx1* e/ou *Stx2* está presente na maioria das cepas de *E. coli* causadores de DTA no mundo, sendo o sorotipo O157:H7 o mais associado a surtos ocasionados pelo consumo de leite e produtos derivados desde o início do século XXI, apesar de ter sido observado pela primeira vez em 1982. Neste ano, a cepa hemorrágica O157:H7 foi responsável por dois surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos e, apesar da sintomatologia diferente do usual, caracterizada por cólicas abdominais, fezes com sangue e pouca ou nenhuma febre, não foi dada a devida importância (RILEY *et al.*, 1983). Essa importância somente veio à tona em 1992 e 1993 quando 35 crianças apresentaram infecção por essa cepa, também nos Estados Unidos (DEL BECCARO *et al.*, 1995).

A presença de microrganismos não entéricos também está associada a patologias em decorrência do consumo de leite e derivados. Um desses microrganismos é a *Brucella melitensis*, uma bactéria gram negativa da família *Brucellaceae*, causadora da brucelose, uma zoonose que pode acometer seres humanos e também os animais produtores, juntamente com a espécie de mesmo gênero *Brucella abortus* (ABDALI *et al.*, 2020).

A brucelose é considerada no mundo inteiro como uma doença transmitida por alimento e também uma doença ocupacional, que atinge, principalmente, trabalhadores de laticínios e propriedades de criação de animais, leiteiros ou de corte. Porém, por ser considerada também uma doença negligenciada, sua prevalência é subnotificada e os dados relativos aos impactos negativos na segurança alimentar em produtos lácteos apresentam importantes inconsistências (DADAR *et al.*, 2020).

Porém, apesar das inconsistências relacionadas a dados oficiais em muitos países, inclusive no Brasil, pesquisadores de vários países do mundo vêm demonstrando que a preocupação com a brucelose é real e medidas preventivas e de controle devem ser colocadas em prática. É importante deixar claro que essa doença possui várias vias de transmissão, além da via alimentar, podendo ser adquirida, inclusive, por trabalhadores rurais e profissionais de laboratório que sofram acidentes com a manipulação da vacina, que é produzida com a bactéria atenuada. O cuidado também se deve ao fato de que se trata de uma doença de alta transmissibilidade,

com sintomatologia inespecífica e que pode afetar diversos órgãos e sistemas, levando o paciente à morte em alguns casos (BABAUGLU *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2020).

Classicamente um contaminante de produtos de avicultura como ovos e frango, espécies do gênero *Salmonella* spp. também estão envolvidas em surtos relacionados a produtos lácteos. Esses microrganismos são responsáveis, anualmente, por 1 em cada 4 casos de doenças diarreicas em todo o mundo, de acordo com a OMS (WHO, 2018). É um microrganismo extremamente versátil e diverso, pois somente em duas espécies, como *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, existem mais de 2500 sorotipos diferentes, muitos deles com fatores de virulência específicos, que dificultam o controle da doença (WHO, 2018; SALAHEEN *et al.*, 2020).

As vacas produtoras de leite são consideradas como reservatórios conhecidos de *Salmonella enterica*, que muitas vezes é transmitida ao homem através da ingestão de leite e derivados. Porém, essa transmissão acontece de forma preponderante quando o leite é consumido cru ou os derivados são produzidos com esse tipo de matéria-prima, já que o processo de pasteurização é suficiente para inativar esses microrganismos (BROM *et al.*, 2020).

A contaminação do leite por salmonelas pode acontecer por diversas vias, como a autoinfecção pelo próprio animal, ou por equipamentos e trabalhadores e/ou por contaminação cruzada com outros animais, como frangos e outras aves. Contudo, em relação às formas de invasão desses microrganismos às células bovinas e posteriormente ao leite, ainda havia muitas dúvidas, até que um estudo de Salaheen (*et al.*, 2020) demonstrou que essa invasão de células epiteliais bovinas é muito diversa a depender dos sorovares presentes nos animais. Os sorovares de *S. enterica* tipo Dublin foram considerados os mais invasivos, enquanto Kentucky, Mbandaka, Cerro e Give foram menos invasivos. Estes resultados podem auxiliar na compreensão do processo de transmissão e nas medidas preventivas que devem ser estabelecidas.

Outros microrganismos importantes para a indústria de alimentos são as espécies do gênero *Listeria*. Esses microrganismos, até algum tempo, eram responsabilizados por pequenos surtos esporádicos, porém, com novas metodologias de identificação molecular, surtos não registrados passaram a ter esses microrganismos como responsáveis (LEPE, 2020).

A listeriose é uma doença alimentar que pode cursar em uma forma grave, invasiva, que pode levar à morte quando o microrganismo sai do ambiente intestinal

e migra para outras partes do corpo, podendo causar dores de cabeça, rigidez no pescoço, febre e convulsões. Além disso, em gestantes a listeriose pode causar aborto espontâneo, natimorto, parto prematuro ou infecção com risco de vida do recém-nascido, principalmente quando a infecção é causada pela espécie mais virulenta, *L. monocytogenes* (CDC, 2021).

Surtos causados devido à ingestão de *Listeria* spp. por meio de alimentos contaminados são cada vez mais frequentes, como o registrado em março de 2021 nos Estados Unidos, em que 11 consumidores de queijos frescos tiveram a doença, 10 deles foram hospitalizados e um foi a óbito, houve, também, registro de um surto em 2017 decorrente de consumo de queijo em que 8 pessoas adoeceram e foram hospitalizadas, com duas morrendo por complicações da doença (CDC, 2017).

Outra patologia cuja falta de boas práticas de fabricação na cadeia do leite pode causar é a campilobacteriose, uma infecção causada por *Campylobacter* spp., especialmente as espécies *C. fetus*, *C. coli* e *C. jejuni*. Em muitos países, as diarreias causadas por esses bacilos gram negativos são mais prevalentes do que a soma das causadas por *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., mostrando a importância das medidas preventivas de combate a essa doença (DAVIS *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2020).

A campilobacteriose também é importante por ser um fator predisponente à presença de patologias associadas graves, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), principal causa de paralisia flácida aguda em países cuja poliomielite foi erradicada. A infecção por *C. jejuni* é o mais frequente fator iniciador da SGB em todo o mundo e a identificação de IgM para esse microrganismo em soro de pacientes com SGB é uma realidade, inclusive na região Nordeste do Brasil (SOUZA *et al.*, 2018).

Muitos animais domésticos, como *pets*, selvagens ou de criação podem ter espécies termotolerantes de *Campylobacter* em seus intestinos. Desse modo, através das fezes esses microrganismos são disseminados no meio ambiente ou causam doença diretamente em criadores ou pessoas que entraram em contato com os animais (HANSSON *et al.*, 2020). Porém, o consumo de leite cru é muito importante nos números que a campilobacteriose registra. Nos Estados Unidos, entre 2007 e 2012, houve um crescimento no aparecimento de infecções por *Campylobacter* spp. (MUNGAI; BEHRAVESH; GOULD, 2015) e em 2014, 99 casos suspeitos dessa doença relacionados ao consumo de leite cru e derivados levaram 10 pessoas ao hospital, registrando uma morte (DAVIS *et al.*, 2016).

No Brasil, um estudo produzido por Gomes e colaboradores (2020) trouxe resultados preocupantes: cepas de *C. coli* e *C. jejuni* coletadas entre 1995 e 2016 de humanos, alimentos, animais e do próprio meio ambiente mostraram-se resistentes a alguns antimicrobianos de uso clínico comum em ambientes nosocomiais e, além disso, algumas delas possuíam similaridades genéticas com cepas encontradas em outros países, o que pode estar relacionado a uma disseminação internacional desses microrganismos multirresistentes.

Essa multirresistência a drogas antimicrobianas não é uma peculiaridade somente dos microrganismos citados anteriormente. O gênero *Staphylococcus* possui uma conhecida capacidade de resistência contra muitos dos fármacos anti-infecciosos utilizados na prática clínica, causando sérios problemas relacionados à saúde pública e gerando prejuízos econômicos enormes em todo o mundo (ZHANG *et al.*, 2014; ASIIMWE *et al.*, 2017; TUCHSCHERR; LÖFFLER; PROCTOR, 2020).

## **1.5 O gênero *Staphylococcus***

### **1.5.1 Características Gerais e Epidemiologia**

O primeiro registro relacionado à família *Micrococcaceae*, da qual os estafilococos fazem parte, foi feito com base em observações do cirurgião escocês Alexander Ogston, em 1880, cujo isolamento de bactérias presentes em 65 amostras de 82 abscessos demonstrou que estas possuíam características “inconfundíveis”, inclusive, descrevendo a presença de bactérias circulares que se agrupavam “em forma de cacho de uva” e de bactérias ligadas aos pares, como “correntes” ou “colares”. A partir deste momento, os *Staphylococcus* e os *Streptococcus* vieram à luz da ciência (OGSTON, 1881).

O gênero *Staphylococcus* é um grande gênero de bactérias gram positivas cocoides, produtoras de catalase, pertencentes à família *Micrococcaceae*, em que algumas são residentes da microbiota natural dos seres humanos e de outros animais, sendo responsáveis por papéis fundamentais na manutenção da homeostase (PACHA *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2021), enquanto algumas são patógenos por excelência, causando infecções relacionadas ao sistema respiratório, cardiovascular, à pele, às meninges ou ao trato gastrointestinal, através da ingestão de alimentos contaminados (TUCHSCHERR; LÖFFLER; PROCTOR, 2020).

As diversas espécies presentes nesse gênero possuem muitas diferenças relacionadas às suas características bioquímicas, inclusive tendo, nessas diferenças, uma forma de diferenciação entre elas. Um dos exemplos mais importantes é a capacidade que algumas espécies possuem de produzir uma enzima chamada coagulase, que pode converter o fibrinogênio plasmático em fibrina, e, conseqüentemente, formar um coágulo visível. Essas bactérias são chamadas de *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) e incluem espécies importantes como *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, presentes principalmente em humanos e animais, respectivamente (SAHIN-TÓTH *et al.*, 2021), além de uma espécie emergente, extremamente relacionada ao *S. aureus*, que vem sendo encontrada, inclusive, em produtos lácteos: *Staphylococcus argenteus* (PUMIPUNTU, 2019).

*Staphylococcus pseudintermedius* foi descrito causando infecção em seres humanos pela primeira vez em estudo publicado por Van Hoovels e colaboradores (2006) em que um paciente apresentou positividade para este microrganismo em exames genotípicos realizados em amostra de pus presente na bolsa em que seu cardioversor desfibrilador implantável estava inserido. Provavelmente, antes deste caso, muitos processos infecciosos foram confundidos com infecções por *S. aureus*, pois os dois microrganismos compartilham várias características fenotípicas, como a produção de coagulase, DNase e  $\beta$ -hemolisina.

Desde o primeiro caso, em 2006, infecções por *S. pseudintermedius* vêm surgindo em todo o mundo e trazem preocupação para as autoridades sanitárias, justificada por essa espécie apresentar fatores de virulência parecidos aos presentes em cepas de *S. aureus*, além de apresentarem transmissão zoonótica de cães para seres humanos, podendo causar bacteremia (BLONDEAU *et al.*, 2020b), infecções persistentes (BLONDEAU *et al.*, 2020a) e possuem cepas que apresentam multirresistência, inclusive contra a metilicina, caracterizada pela presença do gene *mecA* (GAGETTI *et al.*, 2020).

*S. argenteus* é considerada uma espécie emergente do complexo *S. aureus*, de difícil identificação por métodos tradicionais, que vem surgindo em todo o mundo. Muitas vezes, essa espécie é confundida com *S. aureus*, já que as características são bastante parecidas, mas, já existem estudos que demonstraram que cerca da metade dos isolados bacterianos, anteriormente identificados como *S. aureus*, coletados em leites de vacas com mastite na Tailândia, eram, na verdade, *S. argenteus* (PUMIPUNTU, 2019).

No Brasil, poucos estudos sobre esse novo estafilococo coagulase-positivo foram realizados, porém, uma pesquisa realizada por Rossi *et al.* (2020) analisou 856 cepas identificadas como *S. aureus* provenientes de vacas com mastite para verificar se algum isolado, na verdade, seria *S. argenteus*, o que não foi confirmado. Portanto, no Brasil, esse microrganismo parece ainda não ser um problema.

Muitas espécies, porém, não possuem a capacidade de produção de coagulase, importante fator de virulência, e podem ser chamadas de *Staphylococcus* coagulase-negativas (SCN). É importante ressaltar, entretanto, que os estafilococos possuem diversos fatores de virulência distintos e que a falta de coagulase não significa que estas espécies não tenham a capacidade de causar doenças em seres humanos e animais. Cepas de *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* são cada vez mais relacionadas a infecções comunitárias e nosocomiais, incluindo problemas relacionados ao trato geniturinário e infecções em imunocomprometidos (RAUE *et al.*, 2020; LAWAL *et al.*, 2021).

Demonstrando a importância das espécies do gênero *Staphylococcus* para os processos fisiológicos normais, a presença de *S. epidermidis* não demonstra, necessariamente, algo negativo à saúde do ser humano. Ele pode estar presente como um comensal da pele e um dos responsáveis pela proteção contra invasões por microrganismos potencialmente patogênicos. *S. epidermidis* tem papel fundamental na homeostase da pele também através da produção de metabólitos bacterianos benéficos, como bacteriocinas, além de estimularem as células hospedeiras (ex. queratinócitos e células imunes) a produzirem peptídeos antimicrobianos (GALLO; NAKATSUJI, 2011; SANFORD; GALLO, 2013; FOURNIÈRE *et al.*, 2020).

Um estudo genético conduzido por Lawal e colaboradores (2021) demonstrou que as infecções causadas por bactérias estafilocócicas não se restringem somente àquelas consideradas patogênicas por excelência, com o *S. aureus*: infecções de trato urinário humano em 8 países de 4 continentes diferentes durante 20 anos (1997-2017) tiveram como agente etiológico linhagens diferentes de *S. saprophyticus* que possuíam diferenças genéticas entre si e que eram provenientes do processamento de carnes bovinas e suínas, além de, possivelmente, também terem sido destacados da microbiota humana.

Outras espécies de SCN foram descritas como importantes causadoras de infecções, inclusive levando pacientes a internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e à morte, como *S. haemolyticus* e *S. hominis*. Um estudo realizado

na Alemanha entre os anos de 2007 a 2012 mostrou que essas duas espécies demonstravam relevante contribuição para um mau prognóstico dos pacientes com infecções causadas por eles, chegando a quase 10% o número de internações em UTI e mortes em decorrência dessas infecções (FRICKMANN *et al.*, 2018).

Além disso, os microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* vêm demonstrando a capacidade de estarem presentes como responsáveis por infecções secundárias em muitos pacientes com infecções de base ou até promovendo coinfeções. Estudos já demonstraram a presença de SCN incomuns até pouco tempo, como *S. lugdunensis* promovendo infecções de trato urinário em concomitância com *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* e outros SCN, assim como coinfeções com a presença de *S. saprophyticus* e *Corynebacterium* spp. e espécies do gênero *Citrobacter* (CHIU *et al.*, 2020).

Em infecções virais, a presença de estafilococos provendo infecções secundárias também está se tornando cada vez mais comum. Cepas de *S. aureus* vêm sendo responsáveis por promoverem episódios de artrite em crianças juntamente com o vírus da Influenza A (MARI; ZAKI; YAGAN, 2020), assim como vem se mostrando um importante causador de coinfeção em pacientes internados com pneumonia por SARS-CoV-2, aparecendo, algumas vezes, como o microrganismo bacteriano mais prevalente em pacientes adultos internados em UTI com COVID-19 grave (ELABBADI *et al.*, 2021).

## **1.6 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos humanos, sendo encontrado em estreita relação com animais de sangue quente e, conseqüentemente, nos alimentos provenientes destes animais. Nos seres humanos, este microrganismo está presente em diversas partes do corpo, incluindo a pele e a orofaringe, e pode ser transferido aos alimentos, como leite e derivados, causando infecções (LEKE *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018).

Essa bactéria gram positiva está presente na pele e no nariz de cerca de 25% dos animais e seres humanos, não causando doenças na grande maioria das vezes em pessoas saudáveis (CDC, 2018). Porém, muitas dessas bactérias podem são produtoras de enterotoxinas importantes, que podem causar toxinfecções alimentares

e sistêmicas caso entrem em contato com o organismo hospedeiro (BAO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2018).

As infecções causadas por *S. aureus* são extremamente diversas, seja no modo de infecção, nas características do processo ou no prognóstico do paciente. Esse microrganismo pode ser responsável por infecções de pele com ou sem formação de abscessos, pneumonia, endocardite, osteomielite, síndrome do choque tóxico, dentre outras, além, de toxinfecções alimentares (COURJON *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2020; PÉREZ *et al.*, 2020).

A capacidade de sobrevivência de um determinado microrganismo na corrente sanguínea é uma vantagem evolutiva que os SCP possuem em relação a muitas outras bactérias. Esses microrganismos conseguem infectar a corrente sanguínea e se estabelecerem em locais distantes do ponto inicial do processo infeccioso, característica fundamental para explicar as manifestações clínicas severas que *S. aureus* pode demonstrar, como sepse, endocardite, osteomielite, dentre outras (LOWY, 1998; DAVID; DAUM, 2017).

Como falado anteriormente, a capacidade que essa bactéria tem de coagular o sangue é importantíssima na sua diferenciação de outras espécies do gênero, como *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Contudo, essa característica é um fator clássico de virulência que esse microrganismo apresenta, que, fisiologicamente, tem a finalidade de converter o fibrinogênio presente no plasma em fibrina através da ativação da protrombina, formando um coágulo, que atuará protegendo a bactéria do sistema imunológico do indivíduo, inclusive, contra a fagocitose (TAM; TORRES, 2019).

Considerada por muito tempo como uma enzima única, a coagulase é hoje subdividida em duas: a estafilo-coagulase Coa, uma proteína extracelular codificada pelo gene *coa* e a proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWpb), que possui homologia da sua parte N-terminal com a estafilo-coagulase Coa (PEETERMANS; VERHAMME; VANASSCHE, 2015). Sabe-se que as coagulases estafilocócicas são responsáveis também pelo desenvolvimento de uma pseudo-cápsula, responsável pela formação de abscessos, bacteremia e persistência da infecção (BONAR; MIĘDZOBRODZKI; WŁADYKA, 2018).

Além do gene codificador da estafilo-coagulase Coa, também possuem importância vários outros genes codificadores e reguladores, que caracterizam a virulência de várias cepas de *S. aureus*, como genes relacionados à síndrome do choque tóxico (*tst*), esfoliatinas (*eta* e *etb*), leucotoxinas (*lukPV*, *lukED* e *lukM*),



hemolisinas (*hla*, *hly* e *hld*) e toxinas relacionadas ao inibidor da diferenciação celular epidérmica (EDIN), que podem catalisar a ribosilação de ADP da Rho GTPase, um membro da superfamília de Rassmall GTPase de células eucarióticas (COURJON *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

A presença do gene *tst* é um indicativo de que a cepa de *S. aureus* é apta a produzir a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), uma patologia rara, mais prevalente em mulheres no período menstrual que estejam utilizando protetores vaginais, como tampões ou copos menstruais, e que estejam colonizadas por cepas de *S. aureus* que contenham este gene. A toxina consegue chegar à corrente sanguínea e promover episódios de febre, hipotensão, erupção cutânea com descamação subsequente e disfunções de múltiplos órgãos, podendo levar à morte (NONFOUX *et al.*, 2018). Apesar da estreita relação com mulheres em período menstrual, esta síndrome pode também acometer pessoas do sexo masculino e que estejam com qualquer tipo de infecção por *S. aureus* (HANSEN; LETH; NIELSEN, 2020).

Genes responsáveis pela produção de enterotoxinas são muito importantes na patogenia da toxinfecção alimentar por *S. aureus*. Eles são classificados como *sea*, *seb*, *sec*, *see*, *seh*, *sek*, dentre outros, e são responsáveis pela produção de toxinas extracelulares do tipo superantígenos que causam problemas alimentares ao redor do mundo (COSTA *et al.*, 2018).

As enterotoxinas estafilocócicas são causadoras da intoxicação alimentar estafilocócica, doença de início súbito, com vômitos, cólicas abdominais e, em menor frequência, diarreia. Essas enterotoxinas são produzidas em alimentos contaminados por cepas geneticamente aptas quando estes são mantidos em condições favoráveis, por manuseio e armazenamento inadequados (CHEN *et al.*, 2018).

Uma das grandes preocupações relacionadas à produção de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* é que, apesar de essas enterotoxinas estafilocócicas serem produzidas apenas quando há um número suficiente de células microbianas e não serem produzidas quando o alimento contaminado está em temperaturas menores de 10 °C (VAN BOKHORST-VAN DE VEEN *et al.*, 2015), elas apresentam resistência térmica e se mantêm viáveis a causarem intoxicação mesmo quando submetidas ao calor (VAN ASSELT *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2020).

Por estes motivos, a presença de *S. aureus* em alimentos deve receber atenção especial em todas as etapas, desde a escolha das matérias-primas, passando pelo

armazenamento, transporte e processamento. Em alimentos derivados do leite, como o queijo, caso sejam produzidos com leite cru, há a possibilidade da produção de enterotoxinas estafilocócicas em decorrência da microbiota inicial do leite e do tempo de maturação desse queijo em temperaturas em inconformidade com os padrões sanitários (VAN ASSELT *et al.*, 2017).

#### 1.6.1 Contaminação da cadeia do leite por *S. aureus*

A presença de *S. aureus* em alimentos já é bastante conhecida e estudada, provavelmente, em decorrência da grande quantidade de problemas de saúde e de surtos em todo o mundo que esse microrganismo causa todos os anos.

Quando esses microrganismos entram na cadeia produtiva do leite e seus derivados, muitos aspectos devem ser considerados, relacionados à forma em que o microrganismo contaminou aqueles alimentos, como ele se multiplicou, expressou fatores de virulência e infectou consumidores desses produtos. É importante considerar que, independentemente do tipo de leite, seja ele proveniente de bovinos, caprinos, equinos, bufalinos, camelinos ou outros, é possível uma contaminação estafilocócica (BASANISI *et al.*, 2017; CARUSO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2020).

A composição dos tipos de leite também influencia diretamente na microbiota encontrada. Cada animal produz um leite com concentrações diferentes de nutrientes e diversidade de microrganismos presentes (SAEI; PANAHI, 2020).

Xie e colaboradores, em 2020, publicaram um estudo que tinha como objetivo investigar a cinética de crescimento de cepas de *S. aureus* em amostras de leite de camela. Um dos resultados demonstrou que esse leite, em comparação com o leite de vacas, possui maior capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, pois se percebeu que o microrganismo tinha uma taxa de crescimento específico mais baixa do que no leite de vaca. Além disso, a fase de latência, que precede a fase de multiplicação exponencial, era mais longa no leite de camela. Esse fato deve-se por diferença de composição entre os leites, já que o de camela possui alguns compostos antimicrobianos de origem natural.

Uma das formas mais comuns de contaminação do leite por *S. aureus* se dá através de equipamentos contaminados, como ordenhadores automatizados (Figura 3) que não foram limpos e desinfetados de maneira correta, assim como os

tanques de armazenamento do leite recém-ordenhado. A presença de *S. aureus* nesses locais pode afetar a qualidade do leite que será comercializado ou, no caso dos ordenhadores, também ser uma fonte de infecção para os próprios animais, com o microrganismo invadindo o úbere e causando mastite estafilocócica (CORTIMIGLIA *et al.*, 2016; PACHA *et al.*, 2021).

**Figura 3.** A) Momento da ordenha em galpão para esse fim, com dois funcionários do laticínio e encanamentos de passagem do leite cru e B) Vaca leiteira com ordenhador automático acoplado às tetas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A criação de animais diferentes em um mesmo ambiente de produção leiteira também é relevante quando se deseja conhecer prováveis fontes de contaminação desses produtos. Apesar de mamíferos, diferentes espécies de animais leiteiros possuem microbiota específica, com a presença de determinadas cepas que podem contaminar de forma cruzada esses animais. Um exemplo desse fato são as fazendas em que ovinos, caprinos e/ou bovinos são criados concomitantemente: cepas provenientes de vacas apresentaram tipos clonais bem diferentes daquelas encontradas em ruminantes menores (SAEI; PANAHÍ, 2020).

Outra forma de contaminação já bastante conhecida ocorre entre os trabalhadores da fazenda de criação ou que participam da cadeia de produção do leite. Como o *S. aureus* é um microrganismo da microbiota normal dos seres humanos, a falta de hábitos de higiene no momento do processo produtivo, assim como a não utilização de equipamentos de proteção, pode permitir o carregamento de

microrganismos do manipulador para os equipamentos e, também, para o leite (FEßLER *et al.*, 2012; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018).

Um estudo produzido por Marcori (*et al.*, 2017) demonstrou que cepas de *S. aureus* coletadas de amostras de leite e tanques de armazenamento tinham perfil genético muito similar com as que haviam sido identificadas nas mãos e narinas dos trabalhadores da fazenda produtora. Fato que comprova a disseminação entre os protagonistas do processo de cepas estafilocócicas e como esses microrganismos podem afetar a qualidade do produto e da saúde dos consumidores.

Um outro fator relacionado à virulência de *S. aureus* e sua manutenção em equipamentos de ordenha e tanques de armazenamento de leite é a capacidade que esses microrganismos têm de produzirem biofilmes. Esses biofilmes são comunidades microbianas, puras ou mistas, que são formadas quando as células aderem a uma superfície biótica ou abiótica. Após essa adesão, há o crescimento e amadurecimento do biofilme, dificultando a retirada deste das superfícies por processos de limpeza e desinfecção utilizados na rotina (PREFANETA *et al.*, 2014; ACOSTA *et al.*, 2017).

A produção de biofilmes, inclusive, é uma característica mediada pela expressão de dois genes conhecidos como *icaA* e *icaD*, presentes em algumas cepas de *S. aureus*. No Brasil, em um estudo de Acosta (*et al.*, 2017) a presença de cepas possivelmente produtoras de biofilme foi confirmada em 37% dos isolados encontrados em vacas diagnosticadas com mastite, já que foi observado que essas cepas possuíam o gene *icaD*. Não por coincidência, neste mesmo estudo, várias dessas cepas foram consideradas resistentes a vários antimicrobianos pesquisados, mostrando que a produção de biofilme também confere maior resistência a esses microrganismos.

Para prevenir esses problemas, algumas medidas podem ser colocadas em prática, a partir do conhecimento sobre os pontos críticos do processo. Uma forma de evitar a multiplicação de microrganismos em tanques de armazenamento de leite cru é através do controle de temperatura. Os tanques mantidos em temperaturas menores que 6 °C diminuem consideravelmente a proliferação de *S. aureus* (VAN BOKHORST-VAN DE VEEN *et al.*, 2015).

Além da pasteurização de extrema importância para a diminuição da carga microbiana patogênica, no processo de produção de queijo, por exemplo, tem-se o acréscimo de sal para a formação da massa, que impede o crescimento de diversos microrganismos patogênicos e a fermentação do leite para a produção de bebidas

lácteas fermentadas diminui o pH do produto e previne o aparecimento de bactérias indesejadas (VAN ASSELT *et al.*, 2017).

### 1.6.2 Resistência antimicrobiana

Os agentes antimicrobianos desempenham um papel importantíssimo no controle e cura de doenças infecciosas, muitas delas que, tempos atrás eram consideradas a certeza de morte ao indivíduo acometido. Sem dúvida, a introdução dos antimicrobianos na prática médica foi um dos grandes feitos da humanidade no século XX.

O primeiro deles, salvarsan, foi descoberto por Paul Erlich em 1910 e foi utilizado com sucesso no tratamento de 44 pacientes com sífilis pelo médico Arthur Evans, de acordo com seus escritos em 1911 (EVANS, 1911). Desde então, várias classes importantes de antimicrobianos foram descobertas ou desenvolvidas de forma sintética, com objetivo de tratar os mais diversos tipos de infecções que surgiam ano após ano.

Uma das grandes descobertas relacionadas aos antimicrobianos foi a da penicilina, em 1928, com base nos experimentos de Alexander Fleming, que descreveu a substância como sendo proveniente do fungo *Penicillium notatum* e com grande capacidade de inibição seletiva de alguns tipos de bactérias, enquanto em outras, a substância não apresentava efeito antimicrobiano (FLEMING, 1944). A não atividade antimicrobiana observada por Fleming foi considerada resultado de uma resistência bacteriana intrínseca que alguns microrganismos já possuíam em relação à penicilina.

Essa descoberta fez com que a penicilina fosse utilizada contra diversas doenças bacterianas durante décadas, como ainda acontece, muitas vezes de forma irracional, o que favoreceu o desenvolvimento de mecanismos de resistência contra esse antimicrobiano. No ano seguinte à publicação de Fleming sobre a utilização da penicilina em doenças venéreas, o Major Harold H. Plough descreveu a aquisição gradual de resistência por *Staphylococcus* e *Pneumococcus* a esse antimicrobiano (PLOUGH, 1945). Outras descrições como a de Plough se sucederem nas décadas seguintes de forma cada vez mais frequente.

Atualmente, centenas de antimicrobianos diferentes estão disponíveis nos serviços de saúde para o tratamento e salvam bilhões de pessoas em algum momento

de suas vidas. Esses antimicrobianos possuem mecanismos de ação diversos, atacando os microrganismos através de alvos moleculares variados, capazes de causarem alterações importantes no nível metabólico e fisiológico, incluindo modificações na síntese da parede celular, como  $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos, inibindo a síntese de proteínas, como macrolídeos e tetraciclina, inibindo vias metabólicas, como as sulfonamidas, e interferindo com a replicação e tradução de DNA, como as fluoroquinolonas (ZHOU *et al.*, 2015; FUCHS; WANNMACHER, 2017; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e outros atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana, uma estrutura elástica extremamente importante na manutenção da célula, pois impede sua lise em decorrência para pressão osmótica interna. Essa parede celular é formada por peptoglicano, moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) ligados a pequenos peptídeos, e essa ligação é feita com o auxílio da proteína ligadora de penicilina (PBP). Os  $\beta$ -lactâmicos inativam essa proteína e impedem a síntese do peptoglicano (NIKOLAIDIS; FAVINI-STABILE; DESSEN, 2014)

Entretanto, apesar dos diversos fármacos com mecanismos antimicrobianos diferentes, os microrganismos estão em um contínuo trabalho de desenvolvimento de resistência aos a eles, utilizando-se de variados mecanismos, sejam internos, como mutações, ou dependentes do meio externo, como a troca de material genético que contenham genes de resistência entre microrganismos diferentes. O resultado desses processos pode gerar a produção de enzimas hidrolíticas contra fármacos antimicrobianos ou o desenvolvimento de bombas de efluxo que permitem a cepa bacteriana a se tornarem resistentes a diversos tipos de antibióticos ao mesmo tempo (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020).

Segundo a OMS, a resistência antimicrobiana “ocorre quando microrganismos como bactérias, vírus, fungos e parasitas mudam de forma a tornar ineficazes os medicamentos usados para curar as infecções que causam” (WHO, 2017). Essas mudanças, ou mecanismos, acontecem de forma natural entre os microrganismos em muitas situações. Porém, um dos fatores que está acelerando esse processo é a utilização irracional dos fármacos antimicrobianos. Essa utilização gera uma pressão seletiva entre os microrganismos, destruindo àqueles que são sensíveis ao antimicrobiano enquanto os resistentes são selecionados e se disseminarão entre a

população, seja de forma comunitária ou nosocomial (HUGHES; ANDERSSON, 2017; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

A utilização inadequada dos medicamentos facilita o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos e pode ser assim considerada quando se utiliza antibacterianos em infecções virais, através do compartilhamento de antibióticos, utilização de fármacos com baixa qualidade, com base em prescrições equivocadas, além de processos e prevenção e controle do uso de antimicrobianos deficientes (WHO, 2017).

Existem cinco tipos principais de proteínas codificadoras de bombas de efluxo em bactérias: a família da divisão de nodulação por resistência (RND), a superfamília de facilitadores principais (MFS), as famílias de multirresistência estafilocócica (SMR), extrusão de multidrogas e toxinas (MATE) e os transportadores ABC de resistência a múltiplas drogas (cassete de ligação de ATP) (PIDDOCK, 2006; ROY *et al.*, 2021).

Em bactérias gram-positivas existem duas bombas de efluxo que incluem na família MFS, NorA, que é encontrada em *S. aureus* e PmrA encontrada em *Streptococcus pneumoniae*. Ambos (PmrA e NorA) têm doze regiões que abrangem a transmembrana. As bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas MATE são vistas em várias bactérias, incluindo *Vibrio cholerae* (VcrM; VcmA), *Haemophilus influenzae* (HmrM), *P. aeruginosa* (PmpM), *Clostridium difficile* (CdeA) e *S. aureus* (MepA). O PMF (força próton-motriz) e o gradiente de íon sódio são as duas fontes de energia para as bombas de efluxo MATE agirem contra os antimicrobianos (HE *et al.*, 2004; HENDERSON *et al.*, 2021; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2021).

A resistência aos antimicrobianos, porém, não é uma característica somente de bactérias causadoras de doenças em seres humanos. A utilização indiscriminada de antimicrobianos na pecuária também é um fator importante para o surgimento de cepas multidroga resistentes em rebanhos de todo o mundo. Essas substâncias são utilizadas com diversas finalidades, como profilaxia ou tratamento de diversas doenças ou para estimular o crescimento do animal. Vale ressaltar que, além da problemática acerca do aparecimento de cepas resistentes, essa prática também pode gerar resíduos dos antimicrobianos utilizados nos produtos que chegarão ao consumidor final (HOELZER *et al.*, 2017; NJOGA *et al.*, 2018).

A caracterização fenotípica dos microrganismos como resistentes a diversos antimicrobianos foi, durante anos, a principal forma de se compreender como e onde o fenômeno da resistência acontecia.

Entretanto, após o advento dos estudos moleculares, outras características puderam ser estudadas e relacionadas à resistência microbiana, como a presença de genes codificadores de proteínas importantes nesse fenômeno. Por exemplo, para que uma cepa de *S. aureus* seja considerada meticilina-resistente, dois aspectos são avaliados: que antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos sejam ineficazes em testes *in vitro* e que esses microrganismos possuem genes ligados à resistência, como o *mecA* (GIACINTI *et al.*, 2017; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos estão entre as classes terapêuticas de maior sucesso e mais utilizadas contra infecções bacterianas em todo o mundo. Dentre eles, a meticilina, introduzida na terapêutica a partir da década de 1960, foi concebida como uma droga semissintética, com vantagens frente à benzilpenicilina, voltada ao combate de *S. aureus* que já apresentavam características fenotípicas de resistência a outros  $\beta$ -lactâmicos devido à produção de  $\beta$ -lactamases. Especificamente, a meticilina tem um tamanho molecular maior que a penicilina, à custa do grupo dimetoxibenzoíla adicionado ao ácido 6-aminopenicilânico (como radical R1), que confere resistência à ação hidrolítica da penicilinase por impedimento estérico. Essas drogas semissintéticas possuem um radical que as protegem da ação das  $\beta$ -lactamases, porém, cerca de um ano após sua introdução, as primeiras cepas resistentes à meticilina começaram a ser relatadas, demonstrando a grande capacidade plástica do genoma de *S. aureus* em se adaptar à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (ENRIGHT *et al.*, 2002; BERGLUND *et al.*, 2009).

### 1.6.3 MRSA

Apesar de ser um conhecido patógeno há bastante tempo, linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram encontradas a partir da década de 1980 sendo responsáveis por infecções nosocomiais e possuindo como característica a capacidade de resistência a diversos antimicrobianos, tornando-se, atualmente, um patógeno também mundialmente relacionado à comunidade e aos alimentos (STEFANI *et al.*, 2012; ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016).

A presença de MRSA em ambientes hospitalares é documentada há décadas, já que é um ambiente propício ao surgimento desse tipo de cepa devido à pressão seletiva causada pela grande utilização de antimicrobianos (HIGURASHI; OKUZUMI, 2000; DODÉMONT *et al.*, 2018). Porém, o aparecimento na comunidade e,



principalmente, em produtos alimentícios, traz uma preocupação a mais em como prevenir a disseminação deste patógeno (FELTRIN *et al.*, 2015; PARISI *et al.*, 2016).

Esse microrganismo, atualmente, já é conhecidamente causador de infecções comunitárias e hospitalares e são plenamente capazes de produzirem os mesmos fatores de virulências que cepas não MRSA, como enterotoxinas que podem provocar toxinfecções alimentares estafilocócicas quando encontradas em animais de corte, produtores de leite, além do próprio leite e seus derivados e profissionais que trabalhem na cadeia produtiva (BASANISI *et al.*, 2017; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018).

Diferente das demais cepas de *S. aureus*, MRSA têm a capacidade de produzirem uma proteína ligante à penicilina com baixa afinidade às penicilinas semissintéticas (PBP2 ou PBP2a), que faz com que essas cepas sejam pouco sensíveis ao tratamento com esses antibióticos (AMMAR *et al.*, 2016). Essa proteína é conhecidamente codificada por um gene denominado *mecA*, inserido em um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, chamado “*staphylococcal cassette chromosome*” (SCCmec), que se mostrou extremamente capaz de ser transferido entre diferentes cepas de *S. aureus* em decorrência da presença, também, de genes regulatórios (*mecl* e *mecR1*), sequência de inserção e genes codificadores de recombinases, que são responsáveis pela excisão e mobilidade deste elemento genético (MA *et al.*, 2002; AMMAR *et al.*, 2016; KLIBI *et al.*, 2018).

Esta evolução na compreensão de como as cepas de *S. aureus* eram resistentes à penicilina foi graças aos estudos de Song e colaboradores (1987), que trabalharam no sequenciamento genético de cepas estafilocócicas e perceberam a presença de um gene que, alguns anos depois, seria chamada de *mecA* e expressaria um fenótipo de resistência à metilina por essas cepas (MURAKAMI; TOMASZ, 1989; UBUKATA *et al.*, 1989; MATTHEWS; TOMASZ, 1990).

A resistência conferida pela expressão do gene *mecA* é demonstrada por meio de uma taxa reduzida de acilação enzimática mediada por  $\beta$ -lactâmicos e pela diminuição da afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos em comparação com as PBPs nativas. A estrutura química representada como expressão do gene *mecA*, a proteína ligadora de penicilina 2a (PBP2a) forneceu a base estrutural para esta resistência. PBP2a é uma proteína alongada com um domínio transpeptidase, um domínio transmembranar e um domínio de não ligação à penicilina, que possui um sítio alostérico (OTERO *et al.*, 2013).

Isso é uma grande diferença em relação à resistência de *S. aureus* à meticilina em comparação à penicilina. Enquanto a resistência à primeira é mediada por genes que modificam a PBP, à segunda o mecanismo é mediado por plasmídeos que contêm genes codificadores de  $\beta$ -lactamases (DYKE, 1969; DODÉMONT *et al.*, 2018).

Dos genes regulatórios presentes dentro do elemento genético SCCmec, *mecl* é responsável pela repressão do gene *mecA* e *mecR1* é responsável pela codificação da proteína de transcrição de sinal. A transcrição de *mecA* ocorre quando a proteína MecR1 é exposta aos  $\beta$ -lactâmicos com seu domínio extracelular de ligação à penicilina, ativando seu domínio citoplasmático na forma de uma protease. Então, a proteína repressora *mecl* é clivada, bloqueando a região do operador do gene *mecA* e expressando PBP2a (LÓPEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2015).

Em 2007, percebeu-se que uma cepa de *S. aureus* isolada de um tanque de armazenamento de leite de uma vaca com mastite apresentava, fenotipicamente, resistência a meticilina e cefoxitina, porém, ao se promover um *screening* genético nessa cepa, não se detectava nem a presença do conhecido gene *mecA* e nem de PB2a. Essa cepa foi denominada de *S. aureus* LGA251. Ao se fazer o sequenciamento do genoma desse isolado, revelou-se que essa cepa carregava consigo um homólogo do gene *mecA*, denominado posteriormente (em 2012) como *mecC*, com cerca de 69% de similaridade genética a nível de DNA com o gene original e que codificava uma proteína ligante à penicilina com cerca de 63% de similaridade a nível de aminoácidos (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2011; PATERSON *et al.*, 2013).

Outros homólogos relacionados à resistência à meticilina já foram descritos após a descoberta dos genes *mecA* e *mecC*. Em 2009, quando estava sequenciando uma cepa de *Micrococcus caseolyticus* (espécie geneticamente próxima de *S. aureus*) resistente à meticilina, isolada de pele de galinhas, Baba e colaboradores (2009) perceberam a presença de um gene homólogo a *mecA* com 62% de similaridade na sequência de nucleotídeos da cepa de *S. aureus* N315. Este homólogo foi nomeado, em 2012, de *mecB* pela *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements* (IWG-SCC) (ITO *et al.*, 2012).

Posteriormente, o gene *mecB* foi encontrado em uma região plasmidial de uma cepa de *S. aureus* que havia demonstrado a ausência de *mecA* e *mecC*, porém, fenotipicamente era resistente à meticilina. O estudo do sequenciamento genético mostrou que esse gene era 100% idêntico ao encontrado anteriormente em *M. caseolyticus*. Essa cepa estafilocócica foi isolada através de *swab* nasal em um

paciente cardiopata de 67 anos que não tinha nenhum sinal de infecção (BECKER *et al.*, 2018).

Anos depois, Schwendener (*et al.*, 2017) encontraram um novo homólogo de *mecA* em cepas caninas e bovinas de *M. caseolyticus*, mas que não correspondiam a *mecB* e *mecC* e, por isso, denominaram o novo homólogo de *mecD*. Esse homólogo conferiu a essas cepas a resistência a todas as classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, ceftarolina, ceftobiprole e meticilina. Esse gene foi observado em ilhas de resistência genômica denominadas McRI*mecD*-1 e McRI*mecD*-2, que estão associadas a um gene de virulência putativo e a uma integrase específica do local, o que sugere um potencial de propagação entre outras cepas ou espécies.

Desta forma, percebe-se que a resistência apresentada por *S. aureus* a diversos antimicrobianos, incluindo a meticilina, se deve a razões multifatoriais em que se destacam duas: a produção de  $\beta$ -lactamases (codificadas pelo gene *blaZ*), que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas, e a alteração do sítio de ligação destes antibióticos pela produção de proteína ligadora de penicilina adicional, que somente está presente em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (ZHANG *et al.*, 2014; LÓPEZ-VAZQUEZA *et al.*, 2015).

Dois mecanismos contribuem para a resistência às penicilinas em *S. aureus*: primeiro, envolvendo a produção de penicilinase codificada por *blaZ*, que pode inativar a penicilina por meio da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e, segundo, envolvendo uma proteína de ligação a penicilina alterada, PBP2a, codificada por *mecA*. *blaZ* é um gene de 846pb, controlado por dois genes reguladores (antirrepressor *blaR1* e repressor *blaI*) que, após a exposição aos  $\beta$ -lactâmicos, *blaR1* (*transmembrane sensor-transducer*) sofre clivagem autocatalítica, promovendo a clivagem de *blaI* e levando à transcrição de *blaZ* (ZHANG *et al.*, 2014; LÓPEZ-VAZQUEZA *et al.*, 2015).

Todas essas formas de resistência microbiana, seja a outros antibióticos ou à meticilina, acontecem em ambientes diversos, sejam nosocomiais ou comunitários. Por esse motivo, durante os processos de produção e processamento de produtos alimentícios de origem animal, em especial os de origem láctea, deve-se ter cuidado redobrado em situações em que haja o contato direto entre os animais e seres humanos, seja na alimentação e cuidado ao animal, na ordenha ou no abate, pois essas situações facilitam a transferência de microrganismos patogênicos, incluindo

MRSA, dos humanos para os animais e para os produtos derivados destes que irão abastecer as mesas de milhares de famílias (EKTIK *et al.*, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, existem mais de 250 infecções de origem alimentar no mundo, que se manifestam com diferentes sintomas e são causadas por diferentes patógenos, principalmente bactérias, vírus e parasitas. Ao longo dos anos, novos patógenos são continuamente identificados (os chamados patógenos emergentes, como *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli* 157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*), alguns dos quais também se espalharam devido ao aumento do comércio, de recurso à alimentação coletiva, de grandes explorações agrícolas intensivas e de viagens (WHO; FAO, 2020).

Com o passar do tempo, o quadro epidemiológico das doenças de origem alimentar mudou profundamente em função dos hábitos alimentares variados, com o aumento das refeições consumidas fora de casa, do uso frequente de alimentos longa vida e da globalização dos mercados, com os alimentos chegando à mesa dos consumidores, nem sempre estes possuem origem e controle determinados. Este último ponto, sobretudo, garante que os alimentos sejam distribuídos em grandes áreas geográficas, tornando extremamente difícil a investigação epidemiológica voltada para a identificação da fonte em caso de contaminação (FINGER *et al.*, 2019).

Atualmente, um dos agentes bacterianos capazes de causar patologias em humanos e animais é o *Staphylococcus aureus*, um microrganismo que ao longo do tempo também desenvolveu resistência a diferentes classes de antibióticos, tornando-se uma verdadeira emergência sanitária. *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) nos dias atuais estão presentes em diversos ambientes relacionados à alimentação, inclusive, em áreas de produção leiteira e de seus derivados, como o queijo de coalho (ASIIMWE *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020).

Esse alimento, considerado pela população do nordeste brasileiro como patrimônio cultural, é produzido e consumido em larga escala nessa região, muitas vezes tendo o leite cru como matéria-prima, o que o torna um alimento extremamente suscetível à presença de microrganismos, inclusive aqueles multirresistentes que

podem ter sido incorporados ao alimento por meio da cadeia de produção ou até pela seletividade das cepas em decorrência da utilização irracional de antimicrobianos nas zonas pecuaristas (KRUEGER *et al.*, 2020).

Uma pesquisa feita por Diógenes (2017) com jovens do Estado do Ceará mostra que o consumo de queijo tipo coalho ainda permanece em alta por diversos fatores, principalmente pelo caráter regional, sabor e identificação familiar. Isso traz a preocupação relativa à segurança alimentar desse tipo de produto, já que o estudo também mostra que 92% dos participantes disseram que o primeiro contato com o produto foi dentro de casa e, caso esses alimentos estejam contaminados, há uma alta probabilidade de infecção em toda a família.

Deste modo, torna-se importante traçar um perfil de qualidade da cadeia produtiva do queijo de coalho que chega ao consumidor cearense por diversos motivos, entre eles, a possível inserção de cepas de *S. aureus* multirresistentes e de difícil tratamento nos rebanhos leiteiros cearenses, como a falta de boas práticas de produção afeta a qualidade desse produto e a produção de resultados que sirvam de embasamento para a realização de políticas públicas que promovam a educação sanitária dentro dessa cadeia produtiva.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Como objetivo geral da presente tese, busca-se identificar a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijos do tipo coalho provenientes das sete mesorregiões do Estado do Ceará e determinar o perfil virulência e de resistência à metilina e a outros antimicrobianos dos isolados identificados.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Identificar a presença de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo do tipo coalho provenientes de cidades das sete mesorregiões cearenses;
- 3.2.2 Identificar a presença dos genes *blaZ*, *sea*, *seb*, *sec*, *tst1* nos isolados de *S. aureus* para determinar o seu perfil de virulência em relação à expressão de penicilinase ( $\beta$ -lactamase), enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico;
- 3.2.3 Identificar a presença de genes do gene *mecA* para avaliar o perfil de resistência dessas cepas à metilina;
- 3.2.4 Determinar o perfil de sensibilidade das cepas de *S. aureus* provenientes de queijos de coalho aos antimicrobianos.

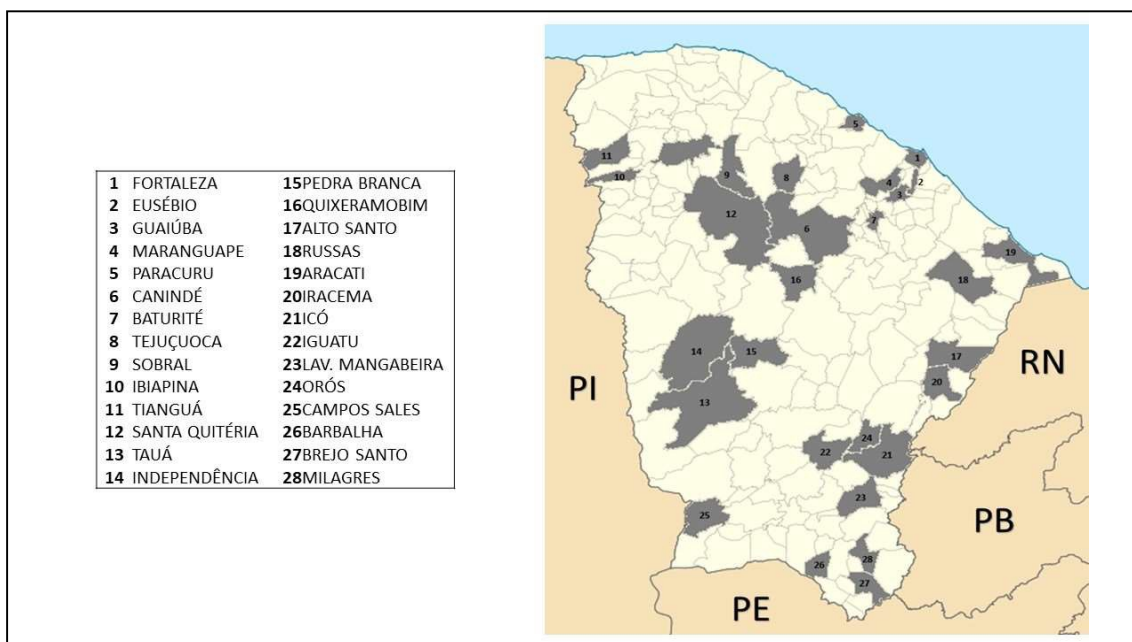
## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo e amostragem**

As amostras de queijos de coalho artesanais foram coletadas em pequenos e médios laticínios de produção de queijos em 28 municípios do Estado do Ceará, divididos igualmente nas sete mesorregiões do Estado (Região Metropolitana de Fortaleza, Norte Cearense, Noroeste Cearense, Sertões Cearense, Centro-Sul Cearense, Sul Cearense e Jaguaribe) e escolhidas mediante sorteio, com 4 municípios por mesorregião (Figura 4). Como o número de laticínios registrados nos órgãos de controle estaduais é bem inferior ao número real, calculou-se em média 18 laticínios por mesorregião, sendo necessária uma amostra de 56 laticínios para a obtenção de um intervalo de confiança estatística de 95%.

As coletas ocorreram entre os meses de março e dezembro de 2018, em uma parceria entre os estabelecimentos produtores, com o Centro Universitário Fametro e a Universidade Federal do Ceará. Em cada município participante da pesquisa foram escolhidos dois laticínios produtores, nos quais foram coletadas duas amostras por laticínio, totalizando 56 laticínios e 112 amostras. Todas as amostras foram obtidas em dulcicata.

**Figura 4.** Mapa do Ceará com a distribuição dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de queijos de coalho artesanais.



**Legenda:** PE: Pernambuco; PI: Piauí; PB: Paraíba; RN: Rio Grande do Norte

As amostras foram adquiridas pesando cerca de 500g e imediatamente embaladas em sacos plásticos esterilizados do tipo “Ziplock”, identificadas, armazenadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo, e enviadas ao laboratório para as análises microbiológicas e moleculares.

#### 4.2 Etapas do Estudo

Para que fossem atendidos os objetivos propostos, a presente pesquisa foi dividida em três etapas fundamentais. A primeira etapa compreendeu o sorteio dos municípios por mesorregião e a busca, nos municípios sorteados, de laticínios cadastrados na Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADAGRI), vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico e Trabalho (CEARÁ, 2018). Em casos em que a cidade não possuía o mínimo de dois estabelecimentos registrados, foram feitas buscas através da internet para encontrar laticínios não registrados. Dentre os encontrados, foi também realizado sorteio.



A segunda etapa compreendeu a ida até os laticínios sorteados e a aquisição dos queijos utilizados nas análises microbiológicas. Toda a coleta foi feita de forma asséptica.

A terceira etapa foi constituída das análises microbiológicas realizadas com os queijos adquiridos em cada laticínio participante da pesquisa. A análise foi realizada nos laboratórios de Microbiologia do Centro Universitário Fametro e no Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Ceará, ambos em Fortaleza/CE.

#### **4.3 Isolamento de *S. aureus***

Para o isolamento e identificação de *S. aureus* foi utilizada a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. O cálculo para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi realizado com base na percepção do número de colônias típicas e atípicas do microrganismo, da diluição inoculada no meio de cultura utilizado e do percentual de colônias confirmadas (BRASIL, 2003).

No laboratório, com o auxílio de bisturis estéreis, as amostras foram cortadas e pesadas 25 g coletadas de diversos pontos do alimento, incluindo superfície e profundidade. Posteriormente, adicionou-se 225 ml de solução salina peptonada 0,1% e as amostras foram submetidas ao processo de homogeneização em “stomacher” por 60 segundos, sendo, a partir desta diluição, realizadas diluições seriadas até  $10^{-5}$ .

Após todas as diluições estarem preparadas foi retirada uma alíquota de 0,1 ml de cada e transferida para a superfície de uma placa de petri contendo agar Baird-Parker enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio e espalhada com auxílio de alça de Drigalski sempre em duplicata.

Todas as placas inoculadas foram levadas à estufa bacteriológica e incubadas por 48 horas a 35 °C – 37 °C. Após o período de incubação, as placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias foram selecionadas, com as colônias sendo divididas em típicas e atípicas. De cada placa onde haviam os dois tipos de colônias, foram retiradas 3 colônias típicas e 2 atípicas; das placas onde haviam somente colônias típicas, foram retiradas 5 colônias; e as placas onde foram observadas somente colônias atípicas, não houve retirada de colônias para testes moleculares,

somente para contagem de UFC/g de amostra. No total, foram selecionadas 306 colônias típicas e 154 colônias atípicas e as colônias típicas foram submetidas à coloração de Gram para a caracterização morfotintorial.

#### 4.3.1 Prova da catalase

Para a comprovação fenotípica dos microrganismos e a diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, foi realizada a prova da catalase. Todas as amostras foram semeadas em tubos com agar Muller-Hinton por 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. Após o tempo de crescimento, foi retirada uma alíquota do material crescido e transferido para uma lâmina de vidro, com auxílio de agulha microbiológica estéril. Em seguida, uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi posta em cima do material na lâmina e observou-se a formação de bolhas.

A prova da catalase foi considerada positiva após o aparecimento quase imediato de bolhas de gás, com característica efervescente (KONEMAN *et al.*, 2001).

#### 4.3.2 Prova da coagulase livre

Para a realização da prova da coagulase, as colônias típicas de *S. aureus* foram previamente semeadas, separadamente, em tubos de ensaio contendo caldo BHI e incubadas entre 35 °C e 37 °C por 24 horas. Após esse período, foram retiradas alíquotas de 0,3 ml de cada tubo de cultivo e transferidas para tubos contendo 0,3 ml de plasma de coelho, que foram, posteriormente, incubados entre 35 °C e 37 °C por 6 horas. Após o período de incubação, os tubos foram observados para verificar a presença de coágulos, de acordo com Brasil, 2003.

Essa prova tem a finalidade de diferenciar presuntivamente o *S. aureus* de outros estafilococos, auxiliando na classificação entre *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos.

### 4.4 Ensaio genotípicos

#### 4.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada com base na utilização de *kit QIAamp DNA miniKit* (Qiagen, Hiden, Germany), seguindo estritamente o que determinado pelo fabricante, acrescentando o tampão de lise *Tris-EDTA Triton X*, lisostafina 10 mg/ml e lisozima 20 mg/ml, sendo o DNA extraído armazenado para posteriores ensaios em freezer a -20 °C.

#### 4.4.2 Multiplex PCR

Todas as cepas de *S. aureus* positivas na prova da coagulase foram submetidas às pesquisas dos seguintes genes: *nuc* e *mecA* (CHEN *et al.*, 2017), *blaZ* (FERREIRA *et al.*, 2017), *sea*, *seb* e *sec* (GRISPOLDI *et al.*, 2019) e *tst1* (ZHAO *et al.*, 2019).

Para a reação foram utilizados 30 ng de DNA genômico, 20 pmol dos *primers* específico para cada gene, 160 µg de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0) e 1,2U de *Taq* (DNA Polimerase Invitrogen, Brasil), gerando um produto reacional com volume total de 25 µl.

A reações de amplificação ocorreram em termociclador (Byocicler) programado para 30 ciclos térmicos completos e foram utilizadas como controles positivos as cepas *S. aureus* padrão ATCC 43300, ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 13566, possuidoras dos genes *mecA* e *nuc*, *sea*, *seb*, *sec* e *tst1*, respectivamente.

Após as reações, os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/ml) e observados em transluminador de UV. Os *primers* utilizados nas reações estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência de primers utilizados e os tamanhos dos amplicons em número de pares de bases

Gene	Primer	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)	Referência
<i>nuc</i>	<i>nuc</i> -F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	279	Kateete <i>et al.</i> , 2010
	<i>nuc</i> -R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>mecA</i>	<i>MecA</i> -F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	McClure <i>et al.</i> , 2006
	<i>MecA</i> -R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		
<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i> -F	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517	Sawant <i>et al.</i> , 2009
	<i>blaZ</i> -R	GCTTGACCACTTTTATCAGC		
<i>sea</i>	<i>sea</i> -F	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	180	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005
	<i>sea</i> -R	CATCGAAACCAGCCAAAGTT		
<i>seb</i>	<i>seb</i> -F	CATCGAAACCAGCCAAAGTT	478	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
	<i>seb</i> -R	TCGCATCAAACCTGACAAACG		
<i>sec</i>	<i>sec</i> -F	ACCAGACCCTATGCCAGATG	371	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005
	<i>sec</i> -R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
<i>tst1</i>	<i>tst1</i> -F	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	300	Akineden <i>et al.</i> , 2001
	<i>tst1</i> -R	TTTCCAATAACCACCCGTTT		

#### 4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para a caracterização do perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* provenientes de queijos de coalho aos antimicrobianos, escolheu-se a metodologia do teste de disco-difusão.

As colônias típicas escolhidas foram semeadas individualmente em ágar nutriente por 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C e, após o crescimento, um inóculo foi ajustado para a padronização de densidade de McFarland 0,5 correspondente a  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml.

Após o inóculo pronto, o mesmo foi inoculado em agar Muller-Hinton com ajuda de swab estéril e os discos de antimicrobianos foram assepticamente aplicados. As placas foram, posteriormente, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h, procedendo-se, após este tempo, a medição do halo de inibição (mm) e a comparação com as zonas de sensibilidade (pontos de corte) fornecidas pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2016).

Os antimicrobianos testados foram: amoxicilina 10 µg, ampicilina 10 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, metilicina 1 µg, tetraciclina

30 µg (LABORCLIN, Brasil), bacitracina 20 µg, ciprofloxacina 5 µg (CECON, Brasil) e sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg (DME, Brasil). Para controle de sensibilidade, foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923 e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os antimicrobianos foram selecionados por serem bastantes utilizados na prática clínica hospitalar e também em ambientes de criação de animais leiteiros. A relação destes, assim como seus mecanismos de ação resumidos estão descritos abaixo, de acordo com Fuchs e Wannmacher (2017):

A amoxicilina é uma penicilina congênere à ampicilina com ação bactericida, e age inibindo, por acilação, a enzima D-alanil-D-alanina transpeptidase, o que promove a interrupção da biossíntese da parede celular bacteriana tanto em bactérias gram positivas quanto em gram negativas. Essa parede celular malformada causa a lise bacteriana quando estão em fluidos orgânicos, pois são, em geral, meios com menos osmolaridade.

A meticilina, como outros antibióticos β-lactâmicos, liga-se a proteínas de ligação à penicilina (PBPs) que enfraquecem ou interferem na formação da parede celular. Os estafilococos são suscetíveis a ela porque a meticilina é resistente à β-lactamase bacteriana produzida por estafilococos.

A bacitracina é um polipeptídico produzido por *Bacillus subtilis* que age de forma parecida às penicilinas e cefalosporinas, interferindo na síntese da parede celular bacteriana. Após sua administração, forma um complexo com C55-isoprenil pirofosfato, transportador envolvido na transferência de peptidoglicano para a parede celular, atrofiando a parede em crescimento.

As tetraciclina são um grupo antimicrobiano utilizados desde a década de 1950, com ação bacteriostática, que age por meio da ligação à porção 30S ribossomal, bloqueando de forma reversível a síntese proteica em microrganismos suscetíveis. Sua disseminação propiciou o desenvolvimento e a propagação de microrganismos resistentes e já há relatos de resistência em praticamente todas as espécies bacterianas.

Assim como as tetraciclina, o cloranfenicol também é um antimicrobiano que atua na inibição da síntese proteica, porém, age sobre a subunidade 50S ribossomal. Muitos mecanismos de resistência microbiana são responsáveis pela diminuição da utilização desse antimicrobiano, como redução da permeabilidade na membrana, mutações ribossomais e produção de acetiltransferases.

A eritromicina foi o primeiro macrolídeo utilizado na prática clínica e é o protótipo do grupo. A classe pode ser considerada bactericida ou bacteriostática, dependendo das concentrações plasmáticas e teciduais, do tamanho das moléculas ou do tamanho do inóculo e tipo de microrganismo. Age por meio da inibição da síntese proteica, ligando-se a subunidade 50S ribossomal.

A gentamicina é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos que age inibindo a síntese proteica através da ligação às subunidades 30S e 50S ribossômicas, que redundam na lise da membrana celular. Como sua entrada na célula é dependente de oxigênio, os aminoglicosídeos não têm boa atividade contra bactérias anaeróbias.

Dentro da classe das quinolonas foi utilizada em nosso estudo a ciprofloxacina, agente bactericida que tem como precursor o ácido nalidíxico. Age inibindo a síntese de DNA bacteriano por meio de bloqueio da atividade enzimática de topoisomerasas, DNA girase e Topoisomerase IV, resultando na clivagem do DNA.

A associação sinérgica entre o sulfametoxazol e o trimetoprim é bastante utilizada na prática clínica. O primeiro é uma sulfonamida, que bloqueia competitivamente a sintase do ácido di-hidropteroico, que é fundamental na via do folato bacteriano. A falta de ácido fólico impede a formação das purinas e timidinas, interferindo na replicação celular. O segundo é uma diamino-pirimidina que potencializa a ação do sulfametoxazol, pois atua também na inibição da rota de formação do ácido fólico.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

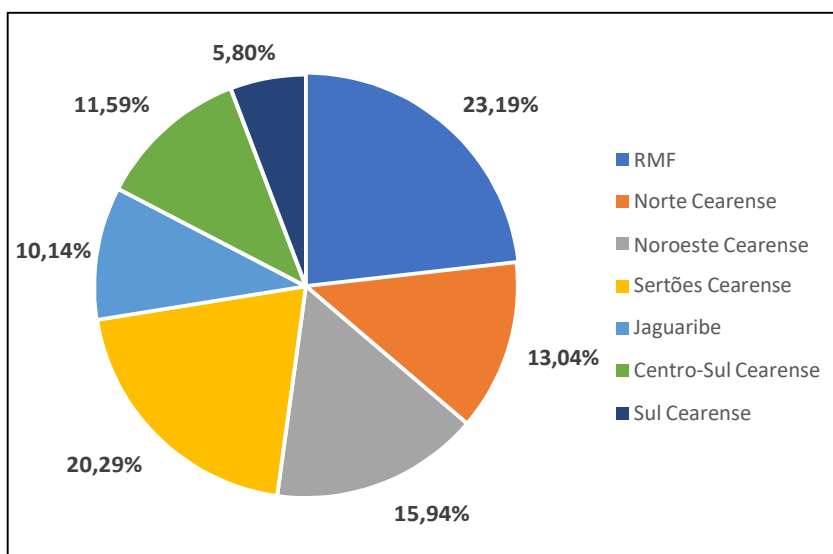
A educação sanitária na produção de alimentos é, hoje, não mais um fator diferenciador dos produtos de consumo, mas, uma exigência fundamental para que o alimento chegue à mesa do consumidor final com boa qualidade física, química e microbiológica. Porém, nos rincões do interior brasileiro e, em especial da Região Nordeste, queijarias artesanais muitas vezes não promovem essa prática, fazendo com que, comumente, relatos de toxinfecções alimentares ganhem os noticiários.

Após as análises em amostras de queijo de coalho produzidos com leite de vacas nos 28 municípios do Ceará escolhidos, observou-se que houve crescimento em agar Baird-Parker em 100% das amostras coletadas. Ao todo, 306 isolados típicos para *Staphylococcus* spp. foram estudados e, destes, 164 (53,54%) foram caracterizados como *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP). Para a

diferenciação entre *Staphylococcus aureus* de outros SCP, ensaios moleculares buscaram a presença do gene *nuc*, específico para essa espécie. Dos 164 SCP, 69 (42,07%) deles foram confirmados molecularmente como *S. aureus*, provenientes de 41 (36,6%) das 112 amostras de queijos analisadas.

Das 69 cepas de *S. aureus* em amostras de queijo de coalho, a maioria foi encontrada naqueles produzidos na RMF (16/23,19%), seguida pelo Sertões (14/20,29%), Noroeste (11/15,94%), Norte (9/13,04%), Centro-Sul (8/11,59%), Jaguaribe (7/10,14%) e Sul (4/5,80%). Destes isolados, 5 (7,25%) demonstram a presença do gene *mecA*, determinando a presença de cepas resistentes à meticilina em produtos destinados à alimentação, sendo 4 cepas na RMF (5,80%), 1 (1,45%) nas regiões Noroeste, Sertões e Sul, cada.

**Gráfico 1.** Distribuição das cepas de *S. aureus* no Ceará



**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza

Com 13% das cepas de *S. aureus* encontradas, a cidade de Fortaleza foi a que possuiu a maior quantidade de positividade para esse microrganismo. Alguns fatores podem sugerir o motivo desse resultado, e um deles pode ser o fato de ser um grande conglomerado urbano em que os trabalhadores necessitam se descolarem em transportes coletivos de passageiros até as queijarias, podendo iniciarem o trabalho na produção sem terem passado por uma higienização eficiente. Deste modo, microrganismos em altas concentrações nas mãos podem ser carreados ao alimento produzido.

De um total de 112 amostras de queijo tipo coalho, 41 (36,6%) apresentaram cepas de *S. aureus* confirmadas pela presença do gene *nuc*. Em cada cidade, 2 laticínios tiveram 2 amostras coletadas em cada um. A positividade para cepas com gene *nuc* foi de 32 laticínios, 57,14% do total de 56 estabelecimentos visitados. Além disso, 56 laticínios produtores de queijo tipo coalho foram visitados para a coleta de amostras e, destes, 32 (57,14%) apresentaram queijos com a presença de colônias típicas de *S. aureus*.

Em relação às amostras com confirmação de *S. aureus*, somente as cidades de Tejuçuoca, Iracema, Brejo Santo e Campos Sales não tiveram isolados *nuc* positivos. Todas as outras, apresentaram uma das quatro amostras com positividade. Do total de 4 amostras por cidade, Fortaleza apresentou todos (100%) os queijos positivos para *S. aureus*, seguida das cidades de Baturité e Quixeramobim com 3 amostras positivas cada (75%), Eusébio, Maranguape, Paracuru, Tianguá, Santa Quitéria, Tauá, Independência, Aracati, Icó e Milagres com 2 amostras positivas (50%), Guaiuba, Canindé, Sobral, Ibiapina, Pedra Branca, Alto Santo, Russas, Iguatu, Lavras da Mangabeira, Orós e Barbalha tiveram 1 amostra positiva cada (25%). Os laticínios e amostras positivas são demonstrados na Tabela 2.



**Tabela 2.** Número de cepas de *S. aureus* isoladas por amostra de queijo, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil.

Laticínio	Queijo	Mesorregião	Cidade	Gene <i>nuc</i>
				N
L1	Q1	RMF	Fortaleza	3
	Q2	RMF	Fortaleza	1
L2	Q3	RMF	Fortaleza	3
	Q4	RMF	Fortaleza	2
L3	Q5	RMF	Eusébio	2
	Q6	RMF	Eusébio	1
L5	Q10	RMF	Guaiuba	1
L7	Q13	RMF	Maranguape	2
L8	Q16	RMF	Maranguape	1
L10	Q19	Norte Cearense	Paracuru	1
	Q20	Norte Cearense	Paracuru	2
L11	Q21	Norte Cearense	Canindé	2
L13	Q25	Norte Cearense	Baturité	1
	Q26	Norte Cearense	Baturité	1
L14	Q28	Norte Cearense	Baturité	2
L18	Q35	Noroeste Cearense	Sobral	3
L19	Q37	Noroeste Cearense	Ibiapina	2
L21	Q42	Noroeste Cearense	Tianguá	1
L22	Q43	Noroeste Cearense	Tianguá	2
L23	Q46	Noroeste Cearense	Santa Quitéria	1
L24	Q48	Noroeste Cearense	Santa Quitéria	2
L25	Q50	Sertões Cearense	Tauá	1
L26	Q51	Sertões Cearense	Tauá	1
L28	Q55	Sertões Cearense	Independência	2
	Q56	Sertões Cearense	Independência	3
L29	Q58	Sertões Cearense	Pedra Branca	1
L31	Q61	Sertões Cearense	Quixeramobim	2
	Q62	Sertões Cearense	Quixeramobim	1
L32	Q64	Sertões Cearense	Quixeramobim	3
L33	Q65	Jaguaribe	Alto Santo	2
L35	Q69	Jaguaribe	Russas	2
L38	Q75	Jaguaribe	Aracati	1
	Q76	Jaguaribe	Aracati	2
L42	Q83	Centro-Sul Cearense	Icó	1
	Q84	Centro-Sul Cearense	Icó	1
L43	Q85	Centro-Sul Cearense	Iguatu	1
L46	Q92	Centro-Sul Cearense	Lavras da Mangabeira	3
L48	Q96	Centro-Sul Cearense	Orós	2
L52	Q103	Sul Cearense	Barbalha	1
L55	Q109	Sul Cearense	Milagres	2
L56	Q111	Sul Cearense	Milagres	1

**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza; N = Número

Algumas cepas estafilocócicas são notadamente agentes infecciosos relacionados ao ambiente agropecuário. Porém, essas estão cada vez mais frequentemente sendo causadoras de infecções humanas (LARSEN *et al.*, 2015).

Encontrada em vacas leiteiras com mastite, seus leites e produtos lácteos, além de tanques de armazenamento, o carreamento desse microrganismo em produtos alimentares para seres humanos pode ser o fator fundamental para o incremento dessas infecções (BENEDETTI *et al.*, 2010; FEßLER *et al.*, 2012; BARDIAU *et al.*, 2013; PARISI *et al.*, 2016).

No presente estudo, quase 40% das amostras de queijo de coalho de todas as regiões do Estado do Ceará apresentaram confirmação da presença de *S. aureus*, demonstrando que esse microrganismo está disseminado nos laticínios cearenses e que estão chegando aos lares dos consumidores, já que as amostras coletadas eram de queijos já prontos para a comercialização. É interessante considerar que as amostras foram coletadas diretamente dos laticínios produtores, não sendo avaliada a qualidade microbiológica após o transporte e armazenamento nos locais de comercialização, etapas ainda passíveis de contaminação estafilocócica.

Oliveira (*et al.*, 2019b) em um estudo realizado para avaliar a presença de SCP em queijos de coalho provenientes de 17 municípios do Ceará, de acordo com análises do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), encontrou 64,9% de positividade para a presença de *S. aureus*, maior do que a que foi encontrada no presente estudo. Porém, no estudo de Oliveira e colaboradores não houve a diferenciação entre as espécies de SCP, como previa a legislação de qualidade alimentar à época, o que pode ter aumentado a porcentagem considerada como *S. aureus*.

Em outro estudo com queijos de coalho comercializados em Fortaleza/CE, 300 amostras, produzidos artesanalmente e industrialmente, foram analisadas e encontrados valores de contaminação por *S. aureus* superiores ao preconizado pela legislação brasileira em ambos os tipos de produto. Além disso, 100% das amostras produzidas artesanalmente possuíam cepas de *S. aureus* (ANDRADE *et al.*, 2019).

Esse resultado corrobora nossos achados em relação à prevalência desse microrganismo em alimentos altamente manipulados, trazendo à luz das políticas sanitárias a alta possibilidade de transferência desses microrganismos do agente produtor ao alimento, através de práticas higiênicas deficientes nas queijarias cearenses.

Atualmente, cepas multirresistentes de *S. aureus* geram grande preocupação nas autoridades sanitárias mundiais. Cepas MRSA estão espalhadas pelo mundo e

sua capacidade de adquirir mecanismos de resistência a antibióticos é preocupante (CHAMBERS; DELEO, 2009).

As cepas de MRSA começaram a aparecer em unidades de saúde, décadas atrás, porém, por motivos diversos, esses espécimes se disseminaram para outros ambientes, gerando a necessidade de classificá-los entre *S. aureus* resistente à meticilina provenientes de ambiente nosocomial (HA-MRSA), *S. aureus* resistente à meticilina associado à comunidade (CA-MRSA) e *S. aureus* resistente à meticilina associado a gado (LA-MRSA) (DITTMANN *et al.*, 2019).

Entretanto, atualmente, há uma certa discussão sobre a real necessidade ou aplicabilidade da classificação destes MRSA de acordo com a sua origem, já que estudos estão, cada vez mais, demonstrando uma sobreposição de linhagens de clones idênticos entre esses grupos. Isso demonstra a alta troca de microbioma pela qual esses microrganismos estão passando, com uma grande variedade de caminhos que passam entre gado, comunidade e ambiente hospitalar (Bal *et al.*, 2016).

No presente estudo, a presença do gene *mecA*, responsável pela expressão do fenótipo de resistência à meticilina em cepas de *S. aureus* foi determinada em 7 (10,14%) das 69 cepas isoladas e a maior parte delas estava em queijos produzidos na cidade de Fortaleza (4/57,14%), seguido por Sobral, Quixeramobim e Barbalha (1/14,29%), com uma cepa *mecA* positiva em cada. Dos 56 laticínios analisados, 5 (8,93%) possuíam *S. aureus* positivos para o gene *mecA* em sua linha de produção, como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Presença do gene *mecA* em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas por amostras de queijos, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil

Laticínio	Queijo	Mesorregião	Cidade	gene <i>mecA</i>
				N
L1	Q1	RMF	Fortaleza	1
L2	Q3	RMF	Fortaleza	2
L2	Q4	RMF	Fortaleza	1
L18	Q35	Noroeste Cearense	Sobral	1
L31	Q61	Sertões Cearense	Quixeramobim	1
L52	Q103	Sul Cearense	Barbalha	1
<b>TOTAL</b>				<b>7</b>

**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza; N = Número

A presença do gene *mecA*, é uma característica importante para a definição de uma cepa de *S. aureus* ser considerada resistente à meticilina. Esse gene é o

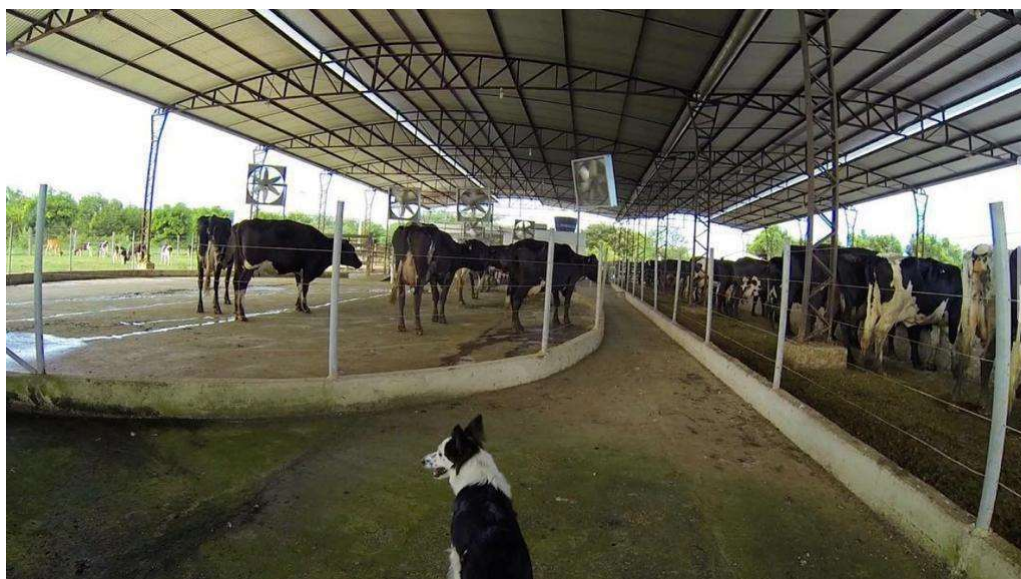
responsável pela expressão de proteína ligante à penicilina com baixa afinidade às penicilinas semissintéticas como a meticilina e está localizado dentro de um elemento genético chamado SCCmec, que pode ser subdivido em tipos que variam de I a XI (RIVA *et al.*, 2015; KLIBI *et al.*, 2018).

Vários estudos demonstram que a presença de MRSA em fazendas produtoras de alimentos lácteos está diretamente relacionada à transferência dessas cepas entre humanos e animais, sejam bovinos, caprinos ou suínos, podendo gerar processos infecciosos nos animais leiteiros, como mastite estafilocócica, afetando a qualidade microbiológica do produto final produzido com essa matéria-prima (FEßLER *et al.*, 2012; RONCO *et al.*, 2017).

Em um estudo de Feßler (*et al.*, 2012) realizado na Holanda, além de animais utilizados para a produção de alimentos, seja de corte ou de leite, outros animais domésticos também podem ser fonte de transmissão cruzada de microrganismos dentro das fazendas. No estudo citado, foram encontradas duas cepas MRSA em amostras de swab nasal de cachorros que viviam no local, em duas fazendas diferentes.

No presente estudo também foi visualizada a presença de animais domésticos convivendo com o gado leiteiro, o que pode representar um fato de perigo na transmissão de microrganismos multirresistentes, como MRSA (Figura 5).

**Figura 5.** Presença de cachorro no estábulo de criação de vacas leiteiras em uma das fazendas visitadas no presente estudo



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A criação extensiva e intensiva de gado em grandes fazendas produtoras, seja de gado leiteiro ou de corte, deixou de ser somente por monocultura e passou a compartilhar espaços com outros tipos de criações, como de suínos, caprinos e ovinos. Deste modo, o surgimento de linhagens MRSA em animais que anteriormente não eram comuns, está se tornando usual (SPOHR *et al.*, 2011; FELTRIN *et al.*, 2015; PAPADOPOULOS *et al.*, 2018).

Essa presença já foi determinada em vários países do mundo, como França (BIETRIX *et al.*, 2019), Índia (GANAI *et al.*, 2015), Itália (BASANISI *et al.*, 2017), Malásia (AKLILU; HUI YING, 2020) e Brasil (MELO *et al.*, 2020), corroborando os achados deste estudo e demonstrando que essa presença está se tornando um problema sanitário global.

Vários estudos demonstram que o tipo de elemento genético SCCmec é importante para a resistência microbiana demonstrada pelos isolados MRSA, inclusive à meticilina. Em alguns, foi constatado que SCCmec tipos I, IV, V, VI e VII usualmente favoreciam a resistência das cepas somente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, enquanto os tipos II e III eram característicos de cepas multirresistentes, em decorrência de plasmídios e transposons contendo genes de resistência que se integravam ao SCCmec (MCKAY, 2008; ASIIMWE *et al.*, 2017).

No Brasil, por exemplo, em um estudo de Rossi *et al.* (2014), uma linhagem de MRSA encontrada em corrente sanguínea de uma paciente hospitalizada, que carregava o cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) tipo IVa e o gene da proteína A de *S. aureus* (*spa*) tipo t292, anteriormente sensível à vancomicina começou a demonstrar diminuição dessa sensibilidade através da aquisição do cluster do gene *vanA* durante a antibioticoterapia. Isso demonstra que pode haver uma correlação entre resistências a diferentes antimicrobianos, incluindo meticilina e vancomicina.

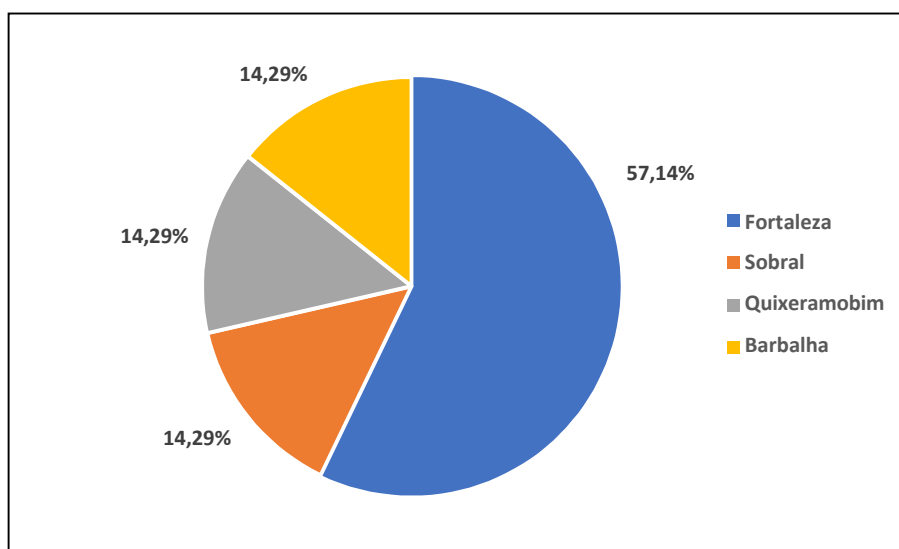
Entretanto, em outros estudos, o tipo de cassete não influenciou de forma crucial à caracterização do perfil de resistência, demonstrando que esse fator é multifatorial e que não há como levar somente essa característica em consideração (ZUTIC *et al.*, 2012; CORTIMIGLIA *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016).

O interior do Estado do Ceará possui, atualmente, três hospitais regionais de atenção terciária, nas cidades de Sobral (Região Norte), Quixeramobim (Sertão Central) e Juazeiro do Norte (Sul Cearense). Na capital, Fortaleza, também há a presença de hospitais terciários, que atendem os mais diversos tipos de

especialidades médicas, inclusive, infecciosas. Todos esses hospitais possuem alas de internação, onde há a prescrição de medicamentos, inclusive, antimicrobianos. Dentre essas cidades, somente Juazeiro do Norte não teve amostragem para esse estudo.

Como observado com os resultados do presente estudo, das 4 cidades onde foram encontradas as cepas de MRSA, somente Barbalha não possui hospital regional de nível terciário. Porém, é importante salientar que a cidade de Barbalha faz parte da Região Metropolitana do Cariri Cearense, juntamente com Juazeiro do Norte, cidade-sede do Hospital Regional do Cariri. Portanto, a presença das cepas MRSA em queijos de coalho de acordo com a cidade da amostra está demonstrada no Gráfico 3.

**Gráfico 2.** Distribuição das cepas MRSA encontradas em amostras de queijo de coalho de acordo com a cidade de produção



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

É necessária uma maior investigação para avaliar se a presença de hospitais terciários nessas cidades ou nas circunvizinhanças está gerando uma fonte de transmissão de cepas MRSA para os alimentos produzidos na região. Há a possibilidade de que pessoas que entraram em contato com a linha de produção dos queijos tenham carregado esses microrganismos do ambiente hospitalar para os alimentos ou animais.

Em outras partes do mundo, a presença de cepas MRSA em leite e produtos lácteos foi identificada a pouco tempo. Na Argentina, somente em 2018 foi relatada a

primeira cepa de MRSA em leite de uma vaca com mastite, em uma análise que utilizou 150 amostras de leite e teve o isolamento de 30 *S. aureus*. É um fato considerado interessante, já que essas cepas estão dispersas em todo o mundo há algum tempo (SREDNIK *et al.*, 2018).

Um dos exemplos dessa dispersão é a alta frequência de cepas MRSA encontradas em amostras de alguns países, como a Jordânia. A prevalência de cepas MRSA em amostras de leite de vaca, em estudo de Obaidat, Salman e Roess (2018), foi acima de 31%, demonstrando que quase  $\frac{1}{3}$  do leite produzido estava contaminado com cepas resistentes.

Contudo, apesar da disseminação ser uma realidade, percebe-se que o percentual de cepas isoladas de MRSA em leite e produtos lácteos é diferente de acordo com os locais, assim como o tempo desde que essas cepas começaram a surgir, como o caso da Argentina, cujo isolamento se deu há poucos anos, quando comparado com outros países.

Esse fato pode ser explicado por diversos fatores, inclusive ambientais, como condições climáticas (sobrevivência de bactérias patogênicas e comensais em ambientes quentes e úmidos) e práticas humanas, como o uso de medicamentos abaixo da dosagem preconizada, o uso empírico de antibióticos, automedicação, ambos em infecções humanas e veterinárias, o uso excessivo e a prescrição desnecessária de antimicrobianos, o uso de agentes de amplo espectro sem dados de sensibilidade, dentre outros (INSTITUTE OF MEDICINE, 2003; CUONG *et al.*, 2018).

Desse modo, a indústria animal, cuja de produtos lácteos está incluída, pode desempenhar um papel crucial no surgimento e transmissão de microrganismos resistentes a antimicrobianos, como os MRSA, pois nos países desenvolvidos cerca de 50-80% do uso total de antibióticos é atribuído à pecuária, em aves, seguido por suínos e laticínios que utilizam o gado como fonte de produção (CUONG *et al.*, 2018).

Ao se avaliar a presença de outros fatores de virulência como a presença do gene *bla<sub>Z</sub>*, das 69 cepas de *S. aureus* testadas, 38 (55,07%) foram consideradas positivas, demonstrando que mais da metade possuíam o gene codificador para produção de  $\beta$ -lactamase. Os detalhes por laticínio, amostra de queijo, cidade e mesorregião estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Número de cepas de *S. aureus* que possuíam o gene *blaZ*, isoladas por amostra de queijo, laticínios, cidades e mesorregiões do Estado do Ceará – Brasil.

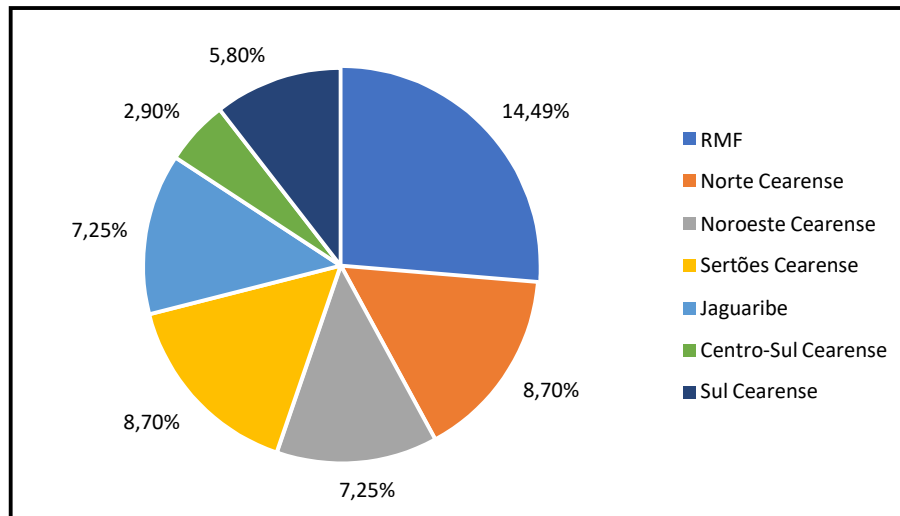
Laticínio	Queijo	Mesorregião	Cidade	<i>gene blaZ</i>
				N
L1	Q1	RMF	Fortaleza	3
L1	Q2	RMF	Fortaleza	1
L2	Q3	RMF	Fortaleza	2
L2	Q4	RMF	Fortaleza	1
L3	Q5	RMF	Eusébio	2
L7	Q13	RMF	Maranguape	1
L10	Q19	Norte Cearense	Paracuru	1
L10	Q20	Norte Cearense	Paracuru	2
L11	Q21	Norte Cearense	Canindé	1
L13	Q25	Norte Cearense	Baturité	1
L13	Q26	Norte Cearense	Baturité	1
L18	Q35	Noroeste Cearense	Sobral	1
L22	Q43	Noroeste Cearense	Tianguá	2
L23	Q46	Noroeste Cearense	Santa Quitéria	1
L24	Q48	Noroeste Cearense	Santa Quitéria	1
L25	Q50	Sertões Cearense	Tauá	1
L28	Q56	Sertões Cearense	Independência	2
L29	Q58	Sertões Cearense	Pedra Branca	1
L31	Q61	Sertões Cearense	Quixeramobim	1
L32	Q64	Sertões Cearense	Quixeramobim	1
L35	Q69	Jaguaribe	Russas	2
L38	Q75	Jaguaribe	Aracati	1
L38	Q76	Jaguaribe	Aracati	2
L42	Q83	Centro-Sul Cearense	Icó	1
L46	Q92	Centro-Sul Cearense	Lavras da Mangabeira	1
L52	Q103	Sul Cearense	Barbalha	1
L55	Q109	Sul Cearense	Milagres	2
L56	Q111	Sul Cearense	Milagres	1
<b>TOTAL</b>				<b>38</b>

**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza; N = Número

É importante considerar que todas as 7 cepas carreadoras do gene *mecA* também possuíam o gene *blaZ*, correspondendo a 18,42% destes isolados, enquanto 31 (81,58%) das 38 cepas *blaZ* positivas carregavam somente o gene *blaZ* e não o gene *mecA*.

A maior presença de cepas *blaZ* positivas foi encontrada na RMF com 10 (14,49%) isolados das 69 cepas de *S. aureus*, sendo seguido pelo Norte Cearense e região dos Sertões, ambos com 6 (8,70%) isolados; Noroeste e Região Jaguaribe apresentaram 5 (7,25%) cepas com esse genótipo; na região Sul foram encontradas 4 (5,80%) isolados e a região Centro-Sul apresentou 2 (2,90%) cepas *blaZ* positivas (Gráfico 3)



**Gráfico 3. Presença do gene *blaZ***

**Legenda:** RMA = Região Metropolitana de Fortaleza

A presença do gene *blaZ* também foi avaliada por Aragão (2019) em queijos de coalho produzidos com leite cru de cabra em Pernambuco. Dos 54 isolados de *S. aureus*, 23 (42,6%) apresentaram esse gene, que confere resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos não estáveis. O resultado foi próximo e corrobora os achados no presente estudo, no qual 55,07% dos isolados mostravam a presença deste gene.

A resistência à penicilina em *S. aureus* se manifesta predominantemente por meio da produção de  $\beta$ -lactamase codificada pelo gene *blaZ*. Este tipo de resistência é determinado por meio deste gene mediado por plasmídeo, que pode ser transferido de um microrganismo a outro, criando a resistência adquirida (PEREIRA *et al.*, 2014). Essa transferência de microrganismos entre as diversas culturas dos processos produtivos pode favorecer o aparecimento de cepas resistentes, já que podem ocorrer fenômenos de troca de informações genéticas entre os novos microrganismos e a microbiota residente (FERNANDEZ-FUENTES *et al.*, 2014).

No presente estudo, das 38 cepas que demonstraram a presença do gene *blaZ*, 29 (76,32%) foram fenotipicamente resistentes à amoxicilina e 11 delas apresentaram fenótipo de resistência à amoxicilina, mesmo sendo *blaZ* negativas. Esse resultado mostra que a resistência às penicilinas, ou, em geral, aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, não é uma característica unifatorial, mas pode ser apresentada por mecanismos diversos à produção de  $\beta$ -lactamases, como acontece nas cepas MRSA.

Em outros estados brasileiros, como o tradicional estado queijeiro de Minas Gerais, uma pesquisa demonstrou que entre 95 cepas do gênero *Staphylococcus* isoladas de queijos minas frescal orgânicos, o gene de resistência à antibiótico mais prevalente foi o *blaZ* (25,3%) seguido por *mecA* (13,7%) e outros (DA SILVA ABREU *et al.*, 2021). Resende *et al.* (2018) também produziram um estudo em Minas Gerais com o mesmo tipo de queijo e encontraram 60% de positividade para o gene *mecA* e menor do que 40% para *blaZ*.

Esses dados diferem do nosso estudo em relação à prevalência do gene que expressa a resistência por  $\beta$ -lactamases, que foi maior que 55%. Já a presença do gene *mecA* foi similar entre o presente estudo e o trabalho desenvolvido por Da Silva Abreu e seus colaboradores.

A presença desse gene já está disseminada no mundo inteiro, tanto em cepas estafilocócicas nosocomiais quanto alimentares. No México, López-Vázquez (*et al.*, 2015) também percentual de cepas contendo o gene *blaZ* próximo ao encontrado nesta pesquisa. Em leite de vacas, 44,7% dos isolados de *S. aureus* possuíam do gene *blaZ*, confirmando que a presença de microrganismos resistente aos  $\beta$ -lactâmicos, que já era um problema recorrente em cepas nosocomiais e clínicas, está cada vez mais comum em microrganismos de origem alimentar.

Vários mecanismos estão envolvidos na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, como a produção de penicilinasas ou a alteração da proteína-alvo. No nosso estudo, a triagem para a presença de *mecA* e *blaZ* entre as cepas de *S. aureus* mostrou uma alta prevalência desses genes, sugerindo que esses microrganismos no queijo podem apresentar parede celular alterada ou produzir  $\beta$ -lactamases. Com base nos resultados desta pesquisa nota-se, claramente, que a disseminação e seleção de bactérias são qresistentes a medicamentos na cadeia alimentar.

Já a resistência à metilina é demonstrada com base na técnica de disco-difusão foi encontrada em 5 (7,25%) cepas de *S. aureus* e, todas elas, apresentaram genótipo com a presença dos genes *mecA* e *blaZ*, sendo encontradas 3 (4,35%) cepas na RMF e 1 (1,45%) nas regiões Noroeste e Sertões, como demonstrado na Tabela 5.

É interessante perceber que duas cepas, uma proveniente da cidade de Fortaleza (RMF) e outra da cidade de Barbalha (Sul Cearense) apresentaram genótipo *mecA* positivo, porém, fenotipicamente, apresentaram ação contra a metilina.

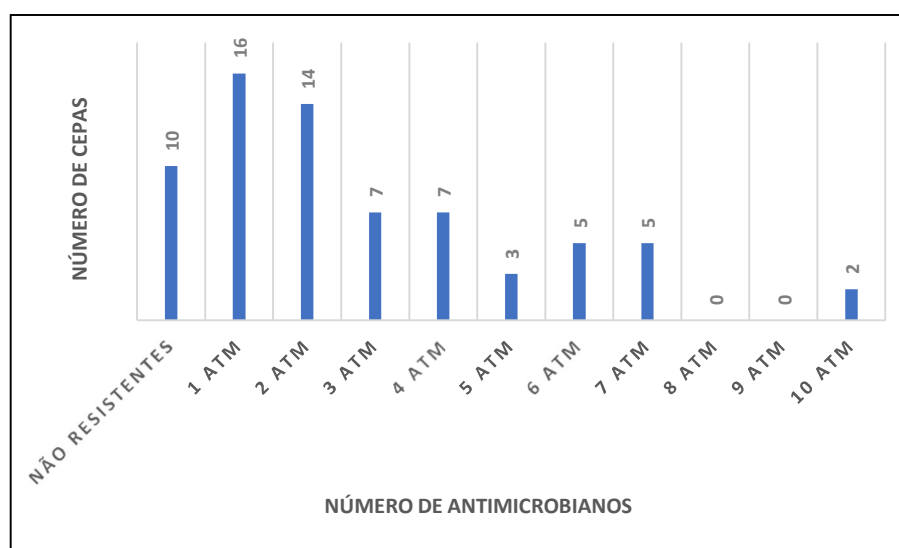
**Tabela 5.** Número e percentual de cepas de *S. aureus* positivas para os genes *nuc*, *mecA* e *blaZ*, além de fenotipicamente resistentes à meticilina por mesorregião do Estado do Ceará – Brasil. O percentual está relacionado à quantidade total de cepas *nuc* + (69).

Região	<i>nuc</i> +		<i>mecA</i> +		<i>BlaZ</i> +		Resistência à Meticilina	
	n	%	n	%	n	%	n	%
RMF	16	23,19%	4	5,80%	10	14,49%	3	4,35%
Norte	9	13,04%	0	0,00%	6	8,70%	0	0,00%
Noroeste	11	15,94%	1	1,45%	5	7,25%	1	1,45%
Sertões	14	20,29%	1	1,45%	6	8,70%	1	1,45%
Jaguaribe	7	10,14%	0	0,00%	5	7,25%	0	0,00%
Centro-Sul	8	11,59%	0	0,00%	2	2,90%	0	0,00%
Sul	4	5,80%	1	1,45%	4	5,80%	0	0,00%
<b>Total</b>	<b>69</b>		<b>7</b>		<b>38</b>		<b>5</b>	

**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza; n = Número.

Das 69 cepas de *S. aureus* identificadas, 10 (14,49%) não apresentaram perfil de resistência a nenhum dos antimicrobianos avaliados, 16 (23,19%) foram resistentes a somente um, 14 (20,29%) a dois antimicrobianos, 7 (10,14%) cepas foram resistentes a três e quatro fármacos, 3 (4,35%) a cinco antimicrobianos diferentes, 5 (7,25%) cepas foram resistentes a seis e a sete antimicrobianos e 2 (2,9%) tiveram perfil de resistência a todos os antimicrobianos analisados. Portanto, 85,51% dos isolados de *S. aureus* mostraram resistência a, pelo menos, um antimicrobiano e 42,03% foram consideradas multirresistentes (3 ou mais antimicrobianos).

**Quadro 4.** Cepas x antimicrobianos



**Legenda:** ATM = Antimicrobiano

Um estudo realizado em Goiás por Ferreira (*et al.*, 2016) mostrou que isolados de *S. aureus* provenientes de queijos artesanais e industriais no Brasil possuíram perfil de resistência diversificado, com 44,1% sendo sensíveis a todos os antimicrobianos avaliados, enquanto 41,4% mostraram-se resistentes a um antimicrobiano e 6,9% foram resistentes a dois antimicrobianos. Esse estudo diverge dos resultados encontrados nessa pesquisa, já que no presente trabalho menos de 15% das cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto o percentual de cepas resistentes somente a um antimicrobiano foi próximo da metade no nosso estudo, se comparado com o de Ferreira e colaboradores (2016).

Este fato demonstra que a presença de MRSA em alimentos de origem animal, como comprovados no presente estudo, podem ser um problema médico também importante, pois a capacidade de expressão de genes de virulência por essas cepas pode gerar microrganismos com alto poder de resistência antimicrobiana.

Para avaliar a resistência antimicrobiana em amostras de queijo coalho comercializadas no Estado do Ceará, foram utilizados vários antimicrobianos comuns na prática clínica humana e veterinária.

O perfil de resistência aos antimicrobianos pelas cepas confirmadas de *S. aureus* de acordo com a amostra, o laticínio de origem, a cidade e a mesorregião a que pertence está descrito na Tabela 6.



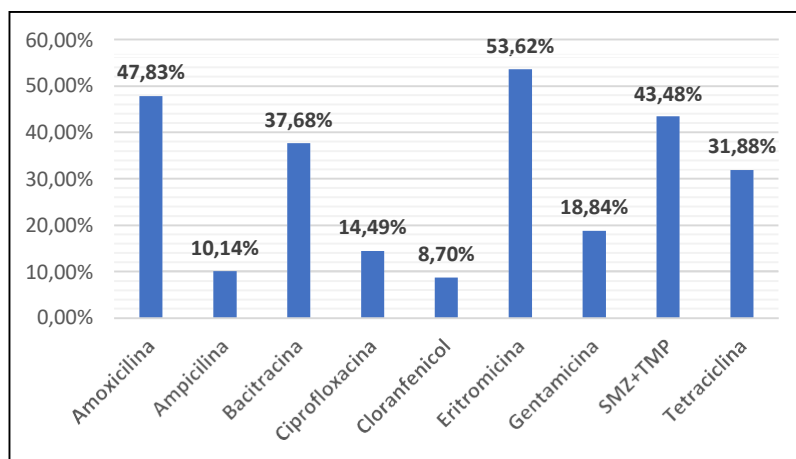
Tabela 6 (cont.).

Laticínio	Queijo	Mesorregião	Cidade	n									
L31	Q61	Sertões Cearense	Quixeramobim	2	1	1				2	2	1	2
L31	Q62	Sertões Cearense	Quixeramobim	1	0		1	1		1		1	1
L32	Q64	Sertões Cearense	Quixeramobim	3	0		1			3		1	
L33	Q65	Jaguaribe	Alto Santo	2	0							1	
L35	Q69	Jaguaribe	Russas	2	0	1		2					
L38	Q75	Jaguaribe	Aracati	1	0	1		1	1			1	
L38	Q76	Jaguaribe	Aracati	2	0	1				1		1	
L42	Q83	Centro-Sul Cearense	Icó	1	0	1							1
L42	Q84	Centro-Sul Cearense	Icó	1	0	1							1
L43	Q85	Centro-Sul Cearense	Iguatu	1	0				1		1		
L46	Q92	Centro-Sul Cearense	Lavras da Mangabeira	3	0						1		1
L48	Q96	Centro-Sul Cearense	Orós	2	0			2			1		
L52	Q103	Sul Cearense	Barbalha	1	1	1		1			1	1	1 1
L55	Q109	Sul Cearense	Milagres	2	0	1	2	1		2	1		2 2
L56	Q111	Sul Cearense	Milagres	1	0						1		1
<b>TOTAL</b>				<b>69</b>	<b>7</b>	<b>33</b>	<b>7</b>	<b>26</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>37</b>	<b>13</b>	<b>30 22</b>

**Legenda:** RMF = Região Metropolitana de Fortaleza; AMO = Amoxicilina; AMP = Ampicilina; BAC = Bacitracina; CIP = Ciprofloxacino; CLO = Cloranfenicol; ERI = Eritromicina; GEN = Gentamicina; SXT = Sulfametoxazol + Trimetoprim; TET = Tetraciclina

No presente estudo, das cepas de *S. aureus* confirmadas, 33 (47,83%) cepas se mostraram resistentes à amoxicilina, 7 (10,14%) à ampicilina, 26 (37,68%) à bacitracina, 10 (14,49%) à ciprofloxacina, 6 (8,7%) ao cloranfenicol, 37 (53,62%) à eritromicina, 13 (18,84%) à gentamicina, 30 (43,48%) ao sulfametoxazol com trimetoprim e 22 (31,88%) à tetraciclina, conforme demonstrado no Gráfico 5.

**Gráfico 5.** Perfil de Resistência dos isolados de *S. aureus*.



**Legenda:** SMZ + TMP = Sulfametoxazol + Trimetoprim

Em um estudo realizado na República Tcheca e Eslováquia com amostras de leite de vacas, ovelhas e cabras, além de swab nasal de funcionários das fazendas leiteiras, 664 cepas estafilocócicas foram isoladas, sendo 557 identificadas como *S. aureus*. Essas cepas, assim como encontrado no presente estudo, apresentaram perfil de resistência antimicrobiana diversificado e com percentuais diferentes dentre os antimicrobianos testados (VYLETĚLOVÁ; VLKOVÁ; MANGA, 2011). Todos os espécimes de *S. aureus* foram resistentes amoxicilina e tetraciclina, corroborando os mesmos percentuais de resistência encontrados nesta pesquisa. Um fato que deve ser considerado, é que no estudo checo/eslovaco a amoxicilina foi testada em associação com o ácido clavulânico e, mesmo assim, a resistência foi completa.

Para outros antimicrobianos, apesar de os percentuais de resistência não serem próximos aos do presente estudo, a tendência de resistência do estudo acima segue na mesma direção: de forma decrescente, o aminoglicosídeo gentamicina teve 56% versus 100% de resistência; o macrolídeo eritromicina apresentou 8% versus 71,43%; e a bacitracina e a quinolona ciprofloxacina foram os que apresentaram

menor percentual de resistência, 0% versus 28,57%, no estudo de Vyleťelová *et al.* (2011) e neste estudo, respectivamente.

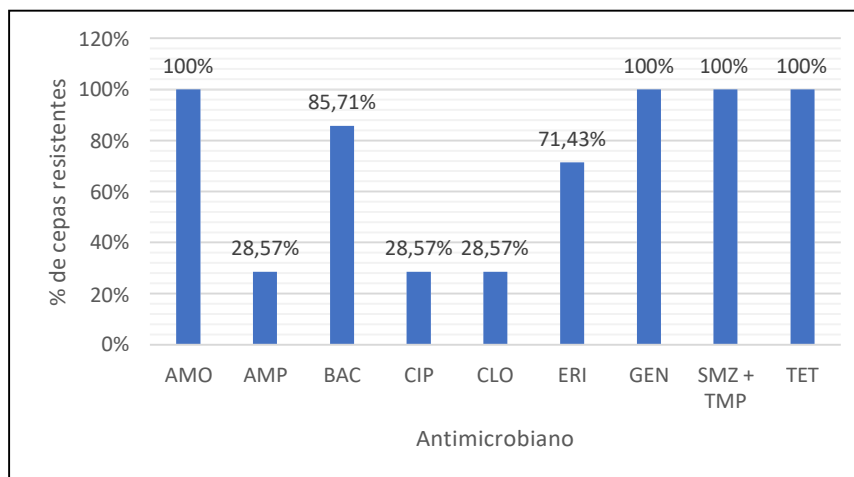
O perfil de resistência detalhado de cada cepa MRSA encontrada no presente estudo encontra-se na Tabela 7, enquanto o percentual de resistência para cada antimicrobiano pelas cepas MRSA está demonstrado no Gráfico 6.



**Tabela 7.** Perfil de resistência das cepas *mecA* positivas

Cepa	Cidade	Antimicrobianos								
		AMO	AMP	BAC	CIP	CLO	ERI	GEN	SMZ+TMP	TET
Cepa 1	Fortaleza	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cepa 2	Fortaleza	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cepa 3	Fortaleza	X		X				X	X	X
Cepa 4	Fortaleza	X		X				X	X	X
Cepa 5	Sobral	X		X			X	X	X	X
Cepa 6	Quixeramobim	X					X	X	X	X
Cepa 7	Barbalha	X		X			X	X	X	X

**Legenda:** AMO = Amoxicilina; AMP = Ampicilina; BAC = Bacitracina; CIP = Ciprofloxacina; CLO = Cloranfenicol; ERI = Eritromicina; GEN = Gentamicina; SMZ+TMP = Sulfametoxazol + Trimetoprim; TET = Tetraciclina

**Gráfico 6.** Perfil de resistência das cepas *mecA* positivas

**Legenda:** AMO = Amoxicilina; AMP = Ampicilina; BAC = Bacitracina; CIP = Ciprofloxacina; CLO = Cloranfenicol; ERI = Eritromicina; GEN = Gentamicina; SMZ+TMP = Sulfametoxazol + Trimetoprim; TET = Tetraciclina

Ammar (*et al.*, 2016) avaliaram a resistência de cepas MRSA isoladas de amostras de leite de vacas, saudáveis e com mastite, além de produtos cárneos comercializados no Egito e encontraram resultados próximos aos do presente estudo em relação à resistência à eritromicina, com mais da metade das cepas apresentando esse perfil, 57,5% e 71,43% entre os estudos egípcios e este, respectivamente.

No Brasil, vários estudos são produzidos todos os anos para avaliar o perfil de resistência de cepas de *S. aureus* ou outros estafilococos presentes em produtos lácteos ou linhas de produção.

Rodrigues (*et al.*, 2017) avaliaram o perfil de resistência de 100 isolados de *S. aureus* provenientes de plantas de produção de queijos do tipo minas comercializados no Estado de São Paulo e encontraram diferença significativa entre os queijos produzidos com leite pasteurizado e leite cru, ocorrendo o isolamento de somente uma cepa no primeiro tipo.

Os pesquisadores mencionados também encontraram diversas cepas de *S. aureus* resistentes aos fármacos avaliados, tendo a penicilina como o antimicrobiano com maior número de cepas resistentes. Neste presente estudo, a penicilina que apresentou o maior número de cepas resistentes foi a amoxicilina, sendo superada somente pelo macrolídeo eritromicina como o antimicrobiano menos efetivo contra as cepas avaliadas *in vitro*.

Os queijos do tipo coalho também podem ser veículos de microrganismos patogênicos, como demonstrado no presente estudo e em estudos discutidos anteriormente. Porém, uma das grandes preocupações se estabelece quando esses microrganismos, além de patogênico, possuem um perfil de multirresistência aos fármacos antimicrobianos.

Amostras de queijo de coalho produzidas com leite cru de cabras avaliadas em estados vizinhos, como Pernambuco e Bahia apresentaram, em um recente estudo, um altíssimo índice de multirresistência, que chegou a 100% de todas as cepas de *S. aureus*. Neste presente estudo, esse número foi menor (42,03%), porém, não se traduz em menor preocupação sanitária, já que quase metade dos isolados apresentou perfil de resistência a três ou mais antimicrobianos (CASTRO *et al.*, 2018).

Além da multirresistência, um outro dado importante foi visualizado no estudo de Castro e colaboradores, citado anteriormente: foram encontrados genes codificadores de enterotoxinas em duas cepas de *S. aureus*, mostrando que o queijo

de coalho produzido com leite cru de cabra da região semiárida do Nordeste do Brasil é um potencial portador do *S. aureus* enterotoxigênico.

Enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxins* – SE) são codificadas por genes já conhecidos (*sea*, *seb*, *sec*, *see*, *seh*, *sek*, dentre outros) e possuem papel importante na patogênese das intoxicações alimentares, já que possuem estabilidade térmica, requerendo temperatura em torno de 100 °C de 5 a 10 minutos para sua inativação, e resistência a enzimas proteolíticas (GONZALEZ *et al.*, 2017).

No presente estudo não foi observada a presença de genes relacionados à enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb* e *sec*). Esse achado é importante por demonstrar que em queijos tradicionais de produção artesanal no Estado do Ceará ainda não apresentam a presença desse grupo de microrganismos produtores de enterotoxinas, que são as cepas de *S. aureus* mais importantes em relação às intoxicações alimentares (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; FETSCH *et al.*, 2014).

Essas enterotoxinas estafilocócicas são produzidas majoritariamente por *Staphylococcus* coagulase-positivo. Em decorrência a resistência térmica, essas toxinas tornam-se importantes fatores nas doenças transmitidas por leite cru e produtos lácteos não pasteurizados, já que, na maioria dos casos, a pasteurização é suficiente somente para eliminar os microrganismos produtores, sem eficientemente inativar as enterotoxinas. Dentre as enterotoxinas estafilocócicas, a do tipo C é a mais comumente produzida por *S. aureus* isolados de animais produtores de leite (ZHANG *et al.*, 2014; RIVA *et al.*, 2015; AL-ASHMAWY *et al.*, 2016).

Estudos relacionados à contaminação por MRSA em leite, produtos lácteos, animais produtores e equipamentos envolvidos no processo produtivo, mostram que a presença de cepas SE-positivas é comum em ambientes como esses em diversos países do mundo, como Taiwan (CHU *et al.*, 2012), China (ZHANG *et al.*, 2014), Itália (RIVA *et al.*, 2015), Paquistão (BAO *et al.*, 2016) e Brasil (GONZALEZ *et al.*, 2017), apesar de não terem sido encontradas no presente estudo.

Al-Ashmawy (*et al.*, 2016), por exemplo, em um estudo realizado no Egito em 2016 avaliaram a presença de vários genes de virulência em cepas de *S. aureus* isolados de leite de vacas, queijos do tipo damietta, queijos do tipo kareish, sorvetes e iogurtes e os resultados foram preocupantes: todos os isolados apresentaram, pelo menos, um gene codificador de enterotoxina entre os avaliados (*sea*, *seb* e *sec*), além de todos possuírem o gene *hla*, responsável pela expressão de  $\alpha$ -hemolisina.

No Paquistão, Bao (*et al.*, 2016) também encontraram altíssima frequência de gene enterotoxigênico em leite de vacas, com um fato interessante, mas que, não parece ter correção genética: todos os isolados de *S. aureus* positivos para o gene *mecA* apresentaram o gene de expressão de enterotoxina do tipo A (*sea*).

Provavelmente, essa “coincidência” aconteceu em decorrência da alta interação genética entre as cepas estudadas e/ou fazerem parte de um mesmo *cluster* genético.

Melo e colaboradores (2020) investigaram a presença de *Staphylococcus* spp. toxigênicos em amostras de leite cru e queijos artesanais, do tipo serrano, produzidos no Estado de Santa Catarina, Região Sul do Brasil. Foram testadas 58 cepas de SCP na busca da presença dos genes enterotoxigênicos *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e o resultado foi positivo para a presença de, pelo menos, um desses genes em 15,51% das cepas, não havendo diferença significativa entre as originadas de amostras de leite cru ou queijo.

Outro queijo artesanal brasileiro bastante conhecido é o “minas frescal”, bastante consumido em todo o Brasil, mas, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. Em outro estudo desenvolvido por Ferreira (*et al.*, 2016) em Goiás para avaliar a presença de genes de enterotoxinas, com uma amplitude de genes maior (*sea-see*, *seg-sej*, *sem-seo*), os resultados foram preocupantes em decorrência de, entre outros achados, 44,8% das cepas apresentarem ao menos um dos genes para enterotoxinas. Porém, o fato de 12 genes diferentes terem sido analisados nesse estudo em comparação com 5 do estudo de Melo (*et al.*, 2020) pode explicar a frequência aumentada.

No queijo do tipo coalho produzido na Região Nordeste também já foram encontrados genes enterotoxigênicos, como os determinados por Oliveira (*et al.*, 2019) quando avaliaram a qualidade microbiológica dos queijos e suas matérias-primas nos estados de Pernambuco e Bahia. Além de todas as cepas isoladas mostraram a presença de *mecA*, 85% dessas cepas apresentaram ao menos 1 gene enterotoxigênico.

Uma hipótese para não ter sido encontrado nenhum gene para a expressão da produção de enterotoxinas pelas cepas achadas no nosso estudo segue o que foi encontrado por Mello (*et al.*, 2016), quando avaliou a presença de genes toxigênicos em vacas diagnosticadas com mastite em diversos estados das regiões Sudeste, Sul e Nordeste do Brasil. Foi encontrada uma frequência relativamente alta desses genes nos isolados quando comparados com outros estudos, principalmente dos genes *sea*

e *sec*, tanto em *S. aureus* quanto em SCN, e todas as cepas de *S. aureus* tiveram alta similaridade entre si, com *clusters* com o mesmo perfil genético em diferentes locais.

Similaridade genética de microrganismos que colonizam o mesmo local é um fator contribuidor, que garante vantagens para a sobrevivência dos mesmos no ambiente. Além disso, facilitam a disseminação de genes entre as cepas, como acontece com o gene *sea*, carregado por profagos e responsável pela maioria dos casos de intoxicações alimentares estafilocócicas em todo o mundo (BORST; BETLEY, 1994; MELLO *et al.*, 2016).

Sendo assim, há a possibilidade de essa disseminação não ter ocorrido entre as cepas circulantes nas fazendas leiteiras e queijarias do Estado do Ceará, tendo o *cluster* prevalente nesse estado a falta de expressão de genes codificadores da produção de enterotoxina, impedindo sua propagação no rebanho e, por consequência, no leite e derivados.

No Estado vizinho de Pernambuco, Aragão (2019) analisou 30 amostras de queijo de 11 municípios, todos na região do Sertão pernambucano, muito similar às regiões cearenses analisadas neste estudo. Os queijos foram produzidos com leite cru de cabras, também bastante comum na Região Nordeste. Os resultados relacionados à presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas corroboram os encontrados nesta pesquisa, não sendo identificado nenhum destes genes.

Outro estudo realizado por Andretta (*et al.*, 2019) também corrobora com os dados da presente pesquisa, pois não encontrou enterotoxinas por testes fenotípicos e nem genes enterotoxigênicos, com base em testes moleculares, em isolados SCP quando avaliaram queijos artesanais do tipo serro, produzido no Estado de Minas Gerais.

Os resultados demonstrados nos estudos anteriormente citados, juntamente com os encontrados na presente pesquisa mostram que a variedade genética das cepas de *S. aureus* circulantes nas fazendas leiteiras no país é muito grande, tendo locais onde a frequência de bactérias SE-positivas é bastante alta, enquanto em outros, somente foram isoladas cepas não enterotoxigênicas.

Esse fato pode estar acontecendo em decorrência da característica principal das fazendas ou criatórios de animais leiteiros para queijos artesanais do país: pequenas propriedades, com pequena capacidade produtiva e pouca comercialização dos animais, havendo pouca interação entre os animais de estabelecimentos e produtores diferentes. Deste modo, em locais onde há a presença de *S. aureus*

enterotoxigênicos a disseminação dessas cepas ocorre intrapropriedade, gerando pontos focais de contaminação.

Além dos genes relacionados às enterotoxinas, o presente estudo também avaliou a presença do gene *tst1*, codificador da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), causadora da síndrome de mesmo nome.

A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico é um dos principais fatores de virulência encontrados *S. aureus*. É uma proteína de 29,1 kDa que, quando entra na corrente sanguínea, provoca a liberação de fator de necrose tumoral do tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produção de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 2 (IL-2), além da proliferação de células T inespecíficas, gerando diversos problemas que podem levar o paciente à morte por choque em até 24 horas caso não haja tratamento rápido e adequado (OTTO, 2014; SHAHINI SHAMS-ABADI *et al.*, 2018).

Nenhuma das cepas avaliadas neste estudo demonstrou a presença desse gene, o que demonstra uma possível segurança dos queijos produzidos no Estado do Ceará em relação à essa doença, que pode ser fatal. A maioria dos estudos avaliados sobre a presença da TSST-1 em leite e derivados produzidos no Brasil, em especial na Região Nordeste, não detectaram cepas com essa característica genética.

A presença do gene *tst1* em cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de vacas foi identificada em um estudo de Klibi (*et al.*, 2018), feito na Tunísia, com animais diagnosticados com mastite. Neste estudo, foram encontrados genótipos de MRSA e *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilicina (MSSA), em que todas as cepas *mecA* positivas também carregavam o gene para enterotoxina *sen* e o gene *blaZ*, enquanto em uma das cepas MSSA foi identificada o gene *tst1*.

Costa (*et al.*, 2018), porém, demonstraram que no Brasil já há casos de cepas *tst* positivas encontradas em vacas com mastite subclínica, em uma frequência de 26,31%, cujo leite produzido e os alimentos derivados poderiam também estar contaminados com esses microrganismos.

As enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da TSST são pirogênicas, consideradas superantígenos e causam efeitos intensos no hospedeiro, sendo fundamental a pesquisa dos genes correlatos em animais e alimentos provenientes destes animais. Além disso, uma atenção especial deve ser dada às cepas de MRSA portadoras do gene *tst1*, pois, embora estudos recentes com o objetivo de se ter uma melhor compreensão da epidemiologia molecular e da detecção de genes de

virulência em isolados de MRSA portadores do gene *tst1*, os dados epidemiológicos sobre MRSA portadores desse gene no Brasil ainda são insuficientes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando toda a análise de resultados, bem como a interrelação com as demais pesquisas no mesmo escopo e em regiões e localidades diversas, percebe-se que a presença de patógenos, especialmente cepas de MRSA e *S. aureus* resistentes à meticilina, é uma realidade em laticínios e pequenas propriedades produtoras de queijo de coalho e sua contaminação reflete na qualidade microbiológica do produto final, gerando risco à saúde dos consumidores, que têm neste produto um tradicional alimento de alto consumo. Porém, apesar da presença destas cepas, os queijos do tipo coalho produzidos no Ceará ainda estão livres de cepas produtoras de enterotoxinas e TSST, fazendo com que seja interessante a prática de medidas que controlem os processos de produção, com o objetivo de impedir que esses microrganismos cheguem aos consumidores e que cepas toxigênicas cheguem ao Estado do Ceará.

Se o uso de antimicrobianos permanecer sem controle em gado leiteiro, a transferência horizontal de genes de resistência antimicrobiana em alimentos pode ser uma preocupação particular para os produtores de alimentos e para a indústria de laticínios.

**Financiador:** O presente estudo teve o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Brasil.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALI, F. *et al.* Prevalence of Brucella species in unpasteurized dairy products consumed in Shiraz province using PCR assay. **Mol Biol Res Commun.**, v. 9, n. 3, p. 117-121, 2020.

ABREU, C. J. **Caminhos antigos e povoamento do Brasil.** Belo Horizonte: Itatiaia, 1988.

ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Dis Mon.**, v. 66, n. 6, 2020.

ACOSTA, A. C. *et al.* Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Med. Vet. (UFRPE)**, v. 11, n. 4, 2017.

ADDIS, M. F. *et al.* The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from omics studies. **Molecular Biosystems.**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 2016.

AKINEDEN, O. *et al.* Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 959-964, 2001.

AKLILU, E.; HUI YING, C. First *mecC* and *mecA* Positive Livestock-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from Dairy Cattle in Malaysia. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

AL-ASHMAWY, M. *et al.* Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy Products. **Foodborne Pathogens and Disease.**, v. 13, p. 156-162, 2016.

AMMAR, A. M. *et al.* Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. **Cellular and Molecular Biology.** v. 62, n. 10, p. 7-15, 2016.

ANDRADE, A. P. C. *et al.* Diversity of *Staphylococcus coagulase*: positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. **B. CEPPA**, v. 36, n. 1, 2019.

ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology.**, v. 16, 2016.

ANDRETTA, M. *et al.* Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **J. Dairy Sci.**, v. 102, n. 12, p. 10790-8, 2019.

ARAGÃO, B. B. *et al.* High frequency of  $\beta$ -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **J. Dairy Sci.**, v. 102, n. 8, p. 6923-7, 2019.

ASIIMWE B. B. *et al.* Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. **BMC Infect Dis.** v. 17, n. 1, 2017.

BABA, T. *et al.* Complete genome sequence of *Macrocooccus caseolyticus* strain JCSCS5402 [corrected], reflecting the ancestral genome of the humanpathogenic staphylococci. **J Bacteriol.**, v. 191, p.1180 –90, 2009.

BABAOGLU, U. T. *et al.* Prevalence of *Brucella* in raw milk: An example from Turkey. **Niger J Clin Pract.**, v. 21, n. 7, p. 907-11, 2018.

BAL, A. M. Genomic insights into the emergence and spread of international clones oh healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: blurring of the traditional definitions. **J. Global Antimicrob. Res.**, v. 6, p. 95–101, 2016.

BÁNKUTI, F. I. *et al.* Farmers' actions toward sustainability: a typology of dairy farms according to sustainability indicators. **Animal.**, v. 14, n. 52, p. s417-s423, 2020.

BAO, H. *ET AL.* Prevalence, enterotoxin gene and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical healthy dairy cows. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 36, p. 270-274., 2016.

BARDIAU, M. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 181-186, 2013.

BASANISI, M. G. *et al.* Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food Microbiology**, v. 62, p. 141-146, 2017.

BASTOS, M. S. R.; ULISSES, I. B.; FONTENELE, M. A. **Queijo de Coalho do Jaguaribe:**

BECKER, K. *et al.* Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis.**, v. 24, n. 2, p. 242-8, 2018.

BENEDETTI, V. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bovine milk samples. **Large Animal Review.** v. 16, p. 67-70, 2010.

BERGLUND, C. *et al.* Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 52, p. 3512-3516, 2008.

BESSA, *et al.* Survey of *Campylobacter* in foods implicated in foodborne diseases in Southern Brazil. **Rev. Int. Med. Trop. São Paulo.**, v. 62, e90, 2020.

BIETRIZ, J. *et al.* Persistence and Diffusion of mecC-Positive CC130 MRSA Isolates in Dairy Farms in Meurthe-et-Moselle County (France). **Front. Microbiol.**, v. 10, n. 47, 2019.

BONAR, E.; JACEK, M. WLADYKA, B. The Staphylococcal Coagulases. *In*: SAVINI, V. **Pet-To-Man Travelling Staphylococci. A World in Progress**. Academic Press. 2018. p. 95-102.

BORST, D. W.; BETLEY, M. J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. **Infect Immun.**, v. 62, n. 1, p. 113-8, 1994.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro – n. 155, Seção 1, Parte I, Página 10785, 07/07/1952.

BRASIL. Decreto-Lei nº 2.384, de 10 de julho de 1940. Cria uma Comissão Executiva para promover, organizar e executar, diretamente, o fornecimento de leite para o Distrito Federal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro - Seção 1, Página 13351, 12/7/1940.

BRASIL. IBGE. Censo Agropecuário 2017. Resultados Definitivos. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6912#resultado>. Acesso em: 23/03/2021.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa. **Diário Oficial da União**, Brasília – n. 136, seção 1, página 13, 16/07/2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. As listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. **Diário Oficial da União**, Brasília – Edição: 249, Seção: 1, Página: 133, 26/12/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção I. 18 de set. 2003.

BROM, R. D. *et al.* Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. **Small Ruminant Research**, v. 189, p. 106123, 2020.

BRUYAND, M. *et al.* Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. **Euro Surveillance**, v. 24, n. 8, 2019.

CARFORA, V. *et al.* Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. **J Dairy Sci**. v. 99, n. 6, p. 4251-8, 2016.

CARUSO, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 26-31, 2016.

CASTRO, J. **Alimentação e Raça**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1936.

CASTRO, R. C. S. *et al.* Lactic acid bacteria as biological control of *Staphylococcus aureus* in coalho goat cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 431–440, 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Staphylococcal (Staph) Food Poisoning. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>. Acesso em: 07 abr 2021.

CDC. Listeria Outbreak Linked to Queso Fresco Made by El Abuelito Cheese Inc. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/index.html>. Acesso em: 07 abr 2021.

CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery (Final Update). **Centers for Disease Control and Prevention**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html>. Acesso em: 07 abr 2021.

CEARÁ. Estabelecimentos Registrados no Serviço de Inspeção Estadual – SIE/ADAGRI - março de 2018. **Governo do Estado do Ceará**. Disponível em: <https://nuvem.adagri.ce.gov.br/index.php/s/clYDjW4Dv3RplUC>. Acesso em: 20 fev 21.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 629-41, 2009.

CHEN, C. *et al.* Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Simultaneous Detection of *mecA*, Nuc, and femB by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **Current Microbiology**. v. 74, p.965-971, 2017.

CHEN, D. *et al.* Characterization of enterotoxin A-producing *Staphylococcus aureus*. **Infect. Drug. Resist.**, v. 2018, n. 11, p. 531-8, 2018.

CHIU, K. H. Y. *et al.* Emergence of *Staphylococcus lugdunensis* as a Cause of Urinary Tract Infection: Results of the Routine Use of MALDI-TOF MS. **Microorganisms**. v. 8, n. 381. 2020.

CHU, C. *et al.* Genetically divergent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and sec-dependent mastitis of dairy goats in Taiwan. **BMC Vet. Res.**, v. 8, n. 39, 2012.

CLARKE ED. Of the Koumiss of the Calmucks, and of the Ardent Spirit Which They Distil from Milk. **Med. Phys. J.**, v. 25, n. 145, p. 250-251. 1811.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3.** Clinical and Laboratory Standards Institute. 26th Edition, Wayne, 2016.

CORTIMIGLIA, C. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in Lombardy Region (Northern Italy). **Epidemiol Infect.** v. 144, n. 14, p. 3046-51, 2016.

COSTA, F. N. *et al.* Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Trop Anim Health Prod.** v. 50, n. 5, p. 1089-97, 2018.

COSTA, M. P.; CEBALLOS, M. C. Benefícios econômicos e sociais relacionados à promoção do bem-estar de bovinos leiteiros e de corte. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín.** v. 74, S17-24, 2021.

COURJON, J. *et al.* EDIN-B Promotes the Translocation of *Staphylococcus aureus* to the Bloodstream in the Course of Pneumonia. **Toxins (Basel)**, v. 7, p. 4131–42, 2015.

CREMONESI, P. *et al.* Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cell. Probes.**, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

CUONG, N. V. *et al.* Antimicrobial Usage in Animal Production: A Review of the Literature with a Focus on Low- and Middle-Income Countries. **Antibiotics (Basel)**, v. 7, n. 3, 2018.

DA SILVA ABREU, A.C. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. **J. Dairy Sci.**, v. 104, n. 4, p. 4012-22, 2021.

DADAR, M. *et al.* Contamination of milk and dairy products by *Brucella* species: A global systematic review and meta-analysis. **Food Res. Int.**, v. 128, 2020.

DALTRO, M. A. *et al.* A. Efeito do estresse térmico por calor na produção de vacas leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 26, n. 1, p. 288-311, 21 out. 2020.

DAVID, M. Z.; DAUM, R.S. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 409, p. 325-83, 2017.

DAVIS, K. R. *et al.* *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption - Utah, 2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention.**, v. 65, n. 12, 2016.

DEL BECCARO, M. A. *et al.* Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome: effect on use of a pediatric emergency department. **Ann. Emerg. Med.**, v. 26, n. 5, p. 598-603, 1995.

DIAS, J.C. **As raízes leiteiras do Brasil**. 11<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Barleus, 2012. p.167.

DIÓGENES, Murilo. **A força do regionalismo no comportamento de compra: um estudo do consumo de queijo do tipo coalho**. 2017. 71f. Monografia (Curso de Administração) – Dep.de Administração – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

DITTMANN, K. *et al.* Correction to: Susceptibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) to chlorhexidine digluconate, octenidine dihydrochloride, polyhexanide, PVP-iodine and triclosan in comparison to hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) and community-acquired MRSA (CA-MRSA): a standardized comparison. **Antimicrob Resist Infect Control.**, v. 8, n. 184, Erratum for: **Antimicrob Resist Infect Control.** v.8, n. 122, 2019.

DODÉMONT, M. *et al.* Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. **J. Cyst. Fibros.**, v. 18, n. 1, p. 86-93 2018.

DOUPHRATE, D. I. *et al.* The dairy industry: a brief description of production practices, trends, and farm characteristics around the world. **J. Agromedicine**, v. 18, n. 3, p. 187-97, 2013.

DUNNE, J. Milk of ruminants in ceramic baby bottles from prehistoric child graves. **Nature**, v. 574, n. 7777, p. 246-8, 2019.

DYKE, K. G. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in methicillin-resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 2, p. 261-78, 1969.

EKTIK, N. *et al.* The Prevalence and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Milk and Dairy Products in Balikesir, **J. Hell. Vet. Med. Soc.**, v. 68, n. 4, p. 613–620, 2017.

ELABBADI A. *et al.* Bacterial coinfection in critically ill COVID-19 patients with severe pneumonia. **Infection.**, p. 1-4, 2021.

ENRIGHT, M. C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 7687–7692, 2002.

EVANS A. The Treatment of Syphilis by Salvarsan (Dioxy-diamido-arseno-benzol): Observations upon Forty-Four Cases. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 2620, p. 617-618, 1911.

FELTRIN, F. *et al.* A Livestock-Associated, Multidrug-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 97 Lineage Spreading in Dairy Cattle and Pigs in Italy. **Appl Environ Microbiol.** v. 82, n. 3, p. 816-21, 2015.

FERNANDEZ-FUENTES, M. A. *et al.* Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. Intl. **J. Food. Microbiol.**, v. 172, p. 49–56, 2014.

FERREIRA, A. M. *et al.* Correlation of Phenotypic Tests With the Presence of the *blaZ* Gene for Detection of Beta-Lactamase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 159-166, 2017.

FERREIRA, M. A. *et al.* Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **J. Dairy Sci.**, v. 99, n. 11, p. 8589-97, 2016.

FEßLER, A. T. *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 77-84, 2012.

FETSCH, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1-6, 2014.

FINGER, J. A. F. F. *et al.* Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 434, 2019.

FLEMING, A. Penicillin in Venereal Diseases-1. Br. **J. Vener. Dis.**, v. 20, n. 4, p. 133-6, 1944.

FOURNIÈRE, M. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1752, 2020.

FRANCO, D.; NAGRALE, B. G. Industria de Laticínios: obstáculos à frente em uma perspectiva econômica. *In*: SUDHAKARAN, V. A.; KUMARI, A. **Dairy processing: Advanced Research to Applications**. Springer, Cingapura, 2020.

FRICKMANN, H. *et al.* Comparison of the etiological relevance of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 8, p. 1539-1545, 2018.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica e Terapêutica**. 5ª Ed. Editora Guanabara Koogan, 2017.

GADD, C. J. Antiquities from Ur. **Temporary exhibition**. Disponível em: <https://www.britishmuseum.org/collection/term/BIB961>. Acesso em: 11 abr 2021.

GALLO, R. L.; NAKATSUJI, T. Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 10, p. 1974-1980, 2011.

GANAI, A. W. *et al.* Detection of *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 86, n. 5, p. 508–511, 2016.

GARCIA-ALVAREZ, L. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p.595– 603, 2011.



[ge&hl=pt-BR](#). Acesso em 09 abr 2021.

GEORGAKAKOS, C. B. *et al.* Dairy farmer perceptions of antibiotic transport and usage in animal agriculture dataset. **Data Brief.**, v. 35, 2021.

GIACINTI, G. *et al.* Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep farms in central Italy. **J. Dairy Sci.**, v. 100, n. 10, p. 7857–7863, 2017.

GOMES, C. N. *et al.* Molecular Epidemiology and Resistance Profile of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated from Different Sources in Brazil. **Microb Drug Resist.**, v. 26, n.12, p. 1516-1525, 2020.

GONZALEZ, A. G. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 364, n. 23, p. 1–7, 2017.

GRIEVE J. An Account of the Method of Making a Wine, Called by the Tartars Koumiss; with Observations on Its Use in Medicine. **Lond Med J.** v. 10, Pt 2, p. 197-210, 1789.

GRILLO, K. M. *et al.* Molecular and isotopic evidence for milk, meat, and plants in prehistoric eastern African herder food systems. **PNAS.** v. 117, n. 18, p. 9793-9, 2020.

GRISPOLDI, L. *et al.* Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **J. Dairy Sci.**, v. 102, 1056-65, 2019.

GUERRA, J. A. *et al.* Comparative genomic analysis of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145:H25 associated with a severe pediatric case of hemolytic uremic syndrome in Davidson County, Tennessee, US. **BMC Genomics**, v. 21, n. 564, 2020.

HAN, X. *et al.* Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 126, p. 91-102, 2018.

HANSEN, N. S. *et al.* Toxic shock syndrome. **Ugeskr Laeger**, v. 182, n. 20, 2020.

HANSSON, I. *et al.* Occurrence of *Campylobacter* spp. in Swedish calves, common sequence types and antibiotic resistance patterns. **J. Appl. Microb.** 2020.

HE, G. X. *et al.* An H(+)-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 1, p. 262-5, 2004.

HENDERSON, P. J. F. *et al.* Physiological Functions of Bacterial "Multidrug" Efflux Pumps. **Chem. Rev.**, 2021.

HIGURASHI, Y.; OKUZUMI, K. Detection methods for drug-resistant bacteria in routine examination—MRSA. **Rinsho Byori**. v. 111, p. 40-7, 2000.

HOELZER, K. *et al.* Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? **BMC Vet. Res.**, v. 13, n. 211, 2017.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Evolutionary Trajectories to Antibiotic Resistance. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 71, p. 579-98, 2017.

HUTCHINGS, M. I. *et al.* Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol.**, v. 51, p. 72-80, 2019.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). Forum on Emerging Infections - Factors contributing to the emergence of resistance. In: KNOBLER, S. L.; LEMON, S. M.; NAJAFI, M.; BURROUGHS, T. **The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment: Workshop Summary**. Washington, DC: National Academies Press (US), 2003.

IPECE. Análise da Cadeia Produtiva do Leite e seus Derivados no Ceará, **Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará**. 2018. Disponível em: [https://www.ipece.ce.gov.br/wpcontent/uploads/sites/45/2018/09/ipece\\_informe\\_128\\_30\\_Maio\\_2018.pdf](https://www.ipece.ce.gov.br/wpcontent/uploads/sites/45/2018/09/ipece_informe_128_30_Maio_2018.pdf). Acesso em: 19 set de 2019.

ITO, T. *et al.* Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, p. 4997–9, 2012.

JARRAUD, S. *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infect Immun.**, v. 70, n. 2, p. 631-41, 2002.

JORNAL DO BRASIL. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, n. 29. 3 fev. 1933a. Disponível em: <https://news.google.com/newspapers?nid=0qX8s2k1IRwC&dat=19330203&printsec=frontpage&hl=pt-BR>. Acesso em 09 abr 2021.

JORNAL DO BRASIL. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, n. 35. 10 fev. 1933b. Disponível em: <https://news.google.com/newspapers?nid=0qX8s2k1IRwC&dat=19330203&printsec=frontpage>

JORNAL DO BRASIL. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, n. 37. 12 fev. 1933c. Disponível em: <https://news.google.com/newspapers?nid=0qX8s2k1IRwC&dat=19330203&printsec=frontpage&hl=pt-BR>. Acesso em: 09 abr 2021.

KATEETE, D. *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, n. 1, 2010.

KIM, K. *et al.* Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 214, n. 1-4, p. 163-174, 2011.

KLIBI, A. *et al.* Molecular Characterization and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates of Milk of Cows with Clinical Mastitis in Tunisia. **Microb. Drug Resist.** v. 00, 2018.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medicina Pan-americana Editora do Brasil, 2001.

KOSTER, H. **Viagens ao Nordeste do Brasil. "Travels in Brazil"**. Tradução e Notas de Luiz da Câmara Cascudo. São Paulo - Rio de Janeiro - Recife - Porto Alegre. Companhia Editora Nacional. 1942.

KRUEGER, A. *et al.* Systems for evaluation of welfare on dairy farms. **Journal Of Dairy Research**, v. 87, n. 1, 2020.

LARSEN, J. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. **Euro surveillance**, v.20, n. 37, 2015.

LAWAL, O. U. *et al.* Foodborne Origin and Local and Global Spread of *Staphylococcus saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 880-893, 2021.

LEITE, E. L. *et al.* Bacteriocins as an alternative in the treatment of infections by *Staphylococcus aureus*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 92, suppl. 2, 2020.

LEKE, A. *et al.* PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains from raw human breast milk. **Clin. Nutr. Exp.**, 2017.

LEPE, J. A. Current aspects of listeriosis. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 154, n. 11, p. 453-8, 2020.

LIMA, L. P. *et al.* A indústria de Laticínios no Brasil – Um Estudo Exploratório. **B. CEPPA**, v. 35, n. 1, 2017.

LÓPEZ-VAZQUEZA, M. *et al.* Detection of *mecA*, *mecl* and *mecR1* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine origin isolated from Family Dairy Farms, Mexico. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 47, n. 2, p. 245-249.

LOWE, R. H. **Roman agriculture as depicted by Cato, Varro, and Vergil**. 1938. 158f. Tese (Master of Arts) – Dep.of Classics – The University of British Columbia, Vancouver.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 8, p. 520-32, 1998.

MA, X. X. *et al.* Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 4, 2002.

MACORI, G. *et al.* Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Ovine Dairy Chain and in Farm-Related Humans. **Toxins (Basel)**, v. 9, n.5, 2017.

MARI, Y. A. *et al.* Co-infection of influenza A with *Staphylococcus aureus* causing bacterial arthritis in a child. **N Z Med J**. 2020.

MARTIN, N. H. *et al.* Symposium review:Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. **J. Dairy Sci.**, v. 101, n. 1, p. 861–870, 2018.

MATTHEWS, P.; TOMASZ, A. Insertional inactivation of the mec gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 1777-9, 1990.

MCCLURE, J. A. *et al.* Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. **J Clin Microbiol**. v. 44, n 3, p. 1141-4, 2006.

MCGUFFEY, R. K.; SHIRLEY, J. E. History of Dairy Farming. *In*. FUQUAY, J. W. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2<sup>a</sup>. ed. p. 2-11, 2011.

MCKAY, A. M. Antimicrobial Resistance and Heat Sensitivity of Oxacillin-Resistant, *mecA* -Positive *Staphylococcus* spp. from Unpasteurized Milk. **J. Food Prot**. v. 71, p. 186–190, 2008.

MELLO, P. L. *et. al.* Detection of Enterotoxigenic Potential and Determination of Clonal Profile in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Brazilian States. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 4, 2016.

MELO, F. D. *et al.* Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates recovered from raw milk and artisanal cheese. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 92, n. 3, 2020.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: Tradição cultural e estratégia de reprodução social na Região Nordeste. **Rev. Geograf. UFPE.**, v. 28, n. 1, 2011.

- MENG, L. *et al.* Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2158. 2017.
- MUNGAI, E. A. *et al.* Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 119-22, 2015.
- MURAKAMI, K.; TOMASZ, A. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 874 – 879, 1989.
- NAKAZAWA, Y.; HOSONO, A. Fermented milk in the orient. *In*: NAKAZAWA, Y.; HOSONO, A. **Functions of fermented milk: challenges for the health sciences**. Elsevier Applied Science, London, p. 61-78, 1992.
- NIKOLAIDIS, I. *et al.* Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. **Protein. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 243-59, 2014.
- NIYAZBEKOVA, Z. *et al.* Compositional and Functional Comparisons of the Microbiota in the Colostrum and Mature Milk of Dairy Goats. **Animals (Basel)**, v. 10, n. 11, p. 1955, 2020.
- NJOGA, E. *et al.* Assessment of antimicrobial drug administration and antimicrobial residues in food animals in Enugu State, Nigeria, **Tropical Animal Health and Production**, v.50, n. 4, p. 897-902, 2018
- NONFOUX, L. *et al.* Impact of Currently Marketed Tampons and Menstrual Cups on *Staphylococcus aureus* Growth and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Production In Vitro. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n. 12, 2018.
- OBAIDAT, M. M. *et al.* High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA* *Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 50, n. 2, p. 405-412, 2018.
- OECD/FAO. "OECD-FAO Agricultural Outlook (Edition 2020)", **OECD Agriculture Statistics (database)**, 2021.
- OGSTON, A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. **Br Med J.** v. 1, n. 1054, 1881.
- OLIVEIRA A. P. *et al.* Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. **Int.J. Dairy Tech.**, v. 73, n. 2, 2019a.
- OLIVEIRA, F. I. P. *et al.* Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em Queijos tipo Coalho. **Revista Científica da Escola de Saúde Pública do Ceará Paulo Marcelo Martins Rodrigues**, v. 13, n. 2, 2019b.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. *et al.* Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1,8-naphthyridines sulfonamides. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 160, 2021.

OTERO, L. H. *et al.* How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 110, 2013.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 17, p. 32-7, 2014.

OZEN, M.; DINLEYICI, E. C. The history of probiotics: the untold story. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 2, p. 159-165, 2015.

PACHA, P. A. *et al.* Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. **J. Dairy Sci.** v. 104, n. 3, p. 3522-31, 2021.

PAPADOPOULOS, P. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. **Food Microbiol.** v. 69, p. 43-50, 2018.

PARISI, A. *et al.* Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. **Food Microbiol.**, v. 58, p. 36–42, 2016.

PATERSON, G. K. *et al.* Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in great Britain. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 69, n. 3, p. 598–602, 2014.

PEETERMANS, M. *et al.* Coagulase Activity by *Staphylococcus aureus*: A Potential Target for Therapy? **Semin Thromb Hemost.** v. 41, n. 4, p. 433-44, 2015.

PEREIRA, C. R. *et al.* Accidental exposure to *Brucella abortus* vaccines and occupational brucellosis among veterinarians in Minas Gerais state, Brazil. **Transbound Emerg Dis.**, 2020.

PEREIRA, L. A. *et al.* Real-time PCR assay for detection of *blaZ* genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, p. 1259-61, 2014.

PÉREZ, V. K. C. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 2111-2122, 2020.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006.

PINCHUK, I. V. *et al.* Staphylococcal enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 8, p. 2177-97, 2010.

PLOUGH, H. H. Penicillin Resistance of *Staphylococcus aureus* and its Clinical Implications. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 15, n. 10, p. 446–451, 1945.

PRENAFETA, A. *et al.* Short communication: biofilm production characterization of *mecA* and *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. **J. Dairy Sci.**, v. 97, n. 8, p. 4838-41, 2014.

PUMIPUNTU, N. *Staphylococcus argenteus*: An emerging subclinical bovine mastitis pathogen in Thailand. **Vet. World.**, v. 12, n. 12, p. 1940-4, 2019.

QUEIROZ, R. **O Não me deixes. Suas histórias e sua cozinha**. Rio de Janeiro: José Olympio, 2000.

RAUE, S. *et al.* The Genome of *Staphylococcus epidermidis* O47. **Front. Microbiol.**, v. 11, 2020.

RESENDE, J. A. *et al.* Antimicrobial-Resistance Genetic Markers in Potentially Pathogenic Gram Positive Cocci Isolated from Brazilian Soft Cheese. **J. Food Sci.**, v. 83, n. 2, p. 377-85, 2018.

RILEY, L. W. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 208, p. 681-5, 1983.

RIVA, A. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: Prevalence, SCC *mec* Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. **J. Food Prot.**, v. 78, n. 6, p. 1142–1146, 2015.

RODRIGUES, M. X. *et al.* Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. **J. Dairy Sci.**, v. 100, n. 7, p. 5167-75, 2017.

RONCO, T. *et al.* Draft Genome Sequence of a Sequence Type 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Danish Dairy Cow with Mastitis. **Genome Announc.**, v. 5, n. 23, 2017.

ROSSI, B. F. *et al.* First investigation of *Staphylococcus argenteus* in a Brazilian collections of *S. aureus* isolated from bovine mastitis. **BMC Vet. Res.**, v. 16, n. 1, 2020.

ROSSI F. *et al.* Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **The New Eng J Med.**, v. 370, p. 15-24-31, 2014.

ROY, S. *et al.* Overexpression of Efflux Pumps, Mutations in the Pumps' Regulators, Chromosomal Mutations, and AAC(6')-Ib-cr Are Associated With Fluoroquinolone Resistance in Diverse Sequence Types of Neonatal Septicaemic *Acinetobacter baumannii*: A 7-Year Single Center Study. **Front. Microbiol.**, v. 12, 2021.

RUSSELL, H. L.; HASTINGS, E. G. Thermal Death Point of the Tubercle Bacillus and its Relation to Commercial Pasteurization of Milk. **Public. Health Pap. Rep.**, v. 26, p. 339-43, 1900.

**Sabor Perpetuado de uma Tradição Secular**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

SAEI, D. H.; PANAHI, M. Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminants: differences in the distribution of clonal types between cattle and small ruminants.. *Arch. Microbiol.*, v. 202, n. 1, p. 115-25, 2020.

SAHIN-TÓTH, J. *et al.* Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. **PLoS One**, v. 16, n. 1, 2021.

SALAHEEN, S. *et al.* Interaction of *Salmonella* enterica with Bovine Epithelial Cells Demonstrates Serovar-Specific Association and Invasion Patterns. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 17, n. 10, p. 608-10, 2020.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars In Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370-377, 2013.

SANTOS, Willian Bonne Monteiro dos. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias na produção de queijo coalho em municípios da região centro-sul do Ceará**. 2019. 49f. Monografia (Curso de Engenharia de Alimentos), Dep. de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SAWANT A. A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Vet. Microbiol.**, v. 134, p. 73-81, 2009.

SCHWENDENER, S. *et al.* Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macroccoccus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. **Sci. Rep.**, v. 7, 2017.

SHAHINI SHAMS-ABADI, M. *et al.* Epidemiology of toxic shock syndrome toxin-1 harboring *Staphylococcus aureus* obtained from clinical samples in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Ann. Ig.**, v. 30, p. 391-400, 2018.

SOARES, E. K. B. *et al.* What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering coalho cheese in the Brazilian northeast and southeast area using word association. **Food Research International**, v. 102, p. 553-558, 2017.

SONG, J. W. *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. **J Food Prot.**, v. 79, n. 10, p. 1725-1732, 2016.

SONG, M. D. *et al.* Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. **FEBS Lett.**, v. 221, p. 167-171, 1987.



SOUZA, C. O. et al. Serological Markers of Recent *Campylobacter jejuni* Infection in Patients with Guillain-Barré Syndrome in the State of Piauí, Brazil, 2014-2016. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 2, p. 586-8, 2018.

SPOHR, M. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health** v. 57, p. 197–203, 2011.

SREDNIK, M. E. et al. First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. **Vet. Anim. Sci.**, v. 7, 2018.

STEFANI, S. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods, **International J. Antim. Agents**, v. 39, n. 4, p. 273-82, 2012.

TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiol Spectr.**, v. 7, n. 2, 2019.

TAPONEN, S. et al. Bovine milk microbiome: A more complex issue than expected. **Veterinary Research**, v. 50, n. 44, 2019.

TUCHSCHERR, L. et al. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). **Front. Microbiol.**, v. 11, 2020.

UBUKATA, K. et al. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 2882-5, 1989.

VAN ASSELT, E. D. et al. Overview of Food Safety Hazards in the European Dairy Supply Chain. **Compr. Ver. Food Sci. Food Saf.**, v. 16, n. 1, p. 59-75, 2017.

VAN BOKHORST-VAN DE VEEN, H.; MINOR, M.; ZWIETERING, M.; NIEROP GROOT, M.; WAGENINGEN, U. R. Microbial Hazards in the Dairy Chain: a Literature Study. In: VAN BOKHORST-VAN DE VEEN, H.; MINOR, M.; ZWIETERING, M.; NIEROP GROOT, M. **Food and Biobased Research**; Wageningen: Report 1553, p. 93, 2015.

VARRO, M. T. **Varro On Farming: M. Terenti Varronis Rerum Rusticarum Libri Tres**. London: G. Bell and Sons, 1912.

VILELA, D. et al. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, 2017.

VIRGILIO. **Éclogas**. Tradução de Christovão Guerner. Porto: Typographia Viúva Alvarez Ribeiro & Filhos, 1825, 136 p.

VON NEUBECK, M. et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 211, p. 57-65, 2015.

VYLETĚLOVÁ, M. *et al.* Occurrence and Characteristics of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin Resistant Coagulase-negative Staphylococci in Raw Milk Manufacturing. **Czech J. Food Sci.** v. 29, special issue, S11-S16, 2011.

WHO, Antimicrobial Resistance. World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/antimicrobial-resistance> Acesso em 08/04/2021. Acesso em 07 abr 2021.

WHO. Foodborne diseases. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1). Acesso em: 06 abr 2021.

WHO. *Salmonella (nontyphoidal)*. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 07 abr 2021.

WHO; FAO. **INFOSAN activity report 2018-2019**. Geneva: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.

WHO; FAO. WHO Estimates of the global burden of foodborne Diseases *In: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. Geneva: World Health Organization, 2015.

XIE, Z. *et al.* Growth kinetics of *Staphylococcus aureus* and background microorganisms in camel milk. **J. Dairy Sci.** v. 103, n. 11, p. 9958-9968, 2020.

YANG, F. *et al.* Prevalence of *blaZ* gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. **Turkish J. Vet. Anim. Sci.** v. 39, n. 5, p. 634-6, 2015.

YOUNG, W. *et al.* Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, 2015.

ZERBONI, A.; NICOLL, K. Enhanced zoogeomorphological processes in North Africa in the human-impacted landscapes of the Anthropocene. **Geomorphology**, v. 331, p. 22-35.

ZHANG, D. *et al.* 16SrDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk. **Int. Dairy J.**, v. 97, p. 86–91, 2019.

ZHANG, M. *et al.* Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology. **Front. Microbiol.**, v. 11, 2020.

ZHANG, T. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and enterotoxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis milk and food poisoning cases. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 13, n. 7, p. 423-9, 2014.

ZHAO, H. *et al.* Molecular Typing and Variations in Amount of *tst* Gene Expression of TSST-1-Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

ZHOU, G. *et al.* The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 9, p. 21711-33, 2015.

ZUTIC, M. *et al.* Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. **African J. Microbiol. Res.** v. 6, p. 5887–89, 2012.

ANEXO A

ARTIGO 1

**TÍTULO:** *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES À METICILINA EM LEITE E DERIVADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DO ANIMAL AO PRODUTO FINAL

**TITLE:** METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN MILK AND MILK PRODUCTS: A SYSTEMATIC REVIEW FROM ANIMAL TO FINAL PRODUCT.

**TÍTULO:** *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A LA METICILINA EN LA LECHE Y DERIVADOS: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA DEL ANIMAL AL PRODUCTO FINAL

**AUTORES:** FELIPE RODRIGUES MAGALHÃES DE AGUIAR, (<https://orcid.org/0000-0002-8457-4452>)<sup>a,b</sup>, NADIA ACCIOLY PINTO NOGUEIRA (<https://orcid.org/0000-0003-0489-9108>)<sup>a</sup>, RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES (<https://orcid.org/0000-0003-3109-9683>)<sup>ac</sup>, TIAGO LIMA SAMPAIO (<https://orcid.org/0000-0002-3962-6508>)<sup>ac</sup>.

<sup>a</sup>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

**Endereço:** Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 - Rodolfo Teófilo - CEP 60430-370 - Fortaleza – CE, Brasil.

<sup>b</sup>CENTRO UNIVERSITÁRIO FAMETRO. **Endereço:** Rua Conselheiro Estelita, 500 – Centro – CEP 60010260 - Fortaleza - CE, Brasil.

<sup>c</sup>DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo presente na microbiota humana e em vários animais de sangue quente. Como resultado das atividades agrícolas, esses microrganismos são frequentemente transferidos para alimentos, como leite e produtos lácteos, o que pode levar a doenças graves de origem alimentar. Durante décadas, diversos estudos demonstraram a capacidade desses microrganismos em adquirir resistência a antimicrobianos, incluindo a meticilina, tornando-se, assim, um grande problema de saúde pública. A presente revisão demonstrou que *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é encontrado contaminando produtos lácteos em todo o mundo, especialmente leite de vaca e queijo, bem como gado e trabalhadores que têm contato próximo com esses alimentos. Nos 58 estudos utilizados nesta revisão, muitos avaliaram quais cepas foram mais prevalentes, mostrando a presença das cepas ST1, ST398 e ST5 como as mais encontradas, além de mostrar a presença de isolados de MRSA codificando enterotoxinas, hemolisinas e outras exotoxinas. Esses achados demonstram que uma supervisão rígida dos processos de produção na indústria de laticínios é necessária desde a fase de produção, evitando contaminações e possíveis problemas para os consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Produtos lácteos; leite; *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes; MRSA.

**ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* is a microorganism present in the microbiota of humans and several warm-blooded animals. As a result of agricultural activities, these microorganisms are often transferred to foods, such as milk and dairy products, which can lead to serious foodborne illness. For decades, several studies have demonstrated the ability of these microorganisms to acquire resistance to antimicrobials, including methicillin, and thus become a major public health problem. The present review demonstrated that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is found contaminating dairy products worldwide, especially cow's milk and cheese, as well as livestock and workers who have close contact with these foods. In 58 studies used in this review, many evaluated which strains were most prevalent, showing the presence of ST1, ST398 and ST5 strains as the most found, besides showing the presence of MRSA isolates encoding enterotoxins, hemolysins and other lexotoxins. These findings demonstrate that rigid supervision of production processes in the dairy industry is necessary from the production stage, avoiding contamination and possible problems for consumers.

**KEY-WORDS:** Dairy products; milk; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo presente en la microbiota de humanos y varios animales de sangre caliente. Como resultado de las actividades agrícolas, estos microorganismos a menudo se transfieren a los alimentos, como la leche y los productos lácteos, lo que puede provocar enfermedades graves transmitidas por los alimentos. Durante décadas, varios estudios han demostrado la capacidad de estos microorganismos para adquirir resistencia a los antimicrobianos, incluida la meticilina, y convertirse así en un importante problema de salud pública. La presente revisión demostró que *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) contamina los productos lácteos en todo el mundo, especialmente la leche de vaca y el queso, así como el ganado y los trabajadores que tienen contacto cercano con estos alimentos. En 58 estudios utilizados en esta revisión, muchos evaluaron qué cepas eran más prevalentes, mostrando la presencia de las cepas ST1, ST398 y ST5 como las más encontradas, además de mostrar la presencia de aislados de MRSA que codifican enterotoxinas, hemolisinas y otras toxinas. Estos hallazgos demuestran que la supervisión rígida de los procesos de producción en la industria láctea es necesaria desde la etapa de producción, evitando la contaminación y posibles problemas para los consumidores.

**PALABRAS-CLAVE:** Productos lácteos; Leche; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; MRSA

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos humanos, sendo encontrado em estreita relação com animais de sangue quente e, conseqüentemente, nos alimentos provenientes destes animais. Nos seres humanos, este microrganismo está presente em diversas partes do corpo, incluindo a pele e a orofaringe, e pode ser transferido aos alimentos, como leite e derivados, causando infecções (LEKE *et al.*, 2017).

Apesar de ser um conhecido patógeno há bastante tempo, linhagens de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) foram encontradas a partir da década de 80 sendo responsáveis por infecções nosocomiais e possuindo como característica a capacidade de resistência a diversos antimicrobianos, tornando-se, atualmente, um patógeno também mundialmente relacionado à comunidade e aos alimentos (Stefanie *et al.*, 2012; Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino, 2016).

A presença de MRSA em ambientes hospitalares é documentada há décadas, já que é um ambiente propício ao surgimento desse tipo de cepa devido à pressão seletiva causada pela grande utilização de antimicrobianos (Dodémont M, *et al.*, 2018; Higurashi Y, Okuzumi K., 2000). Porém, o aparecimento na comunidade e, principalmente, em produtos alimentícios, traz uma preocupação a mais em como prevenir a disseminação deste patógeno (FELTRIN *et al.*, 2015; PARISI *et al.*, 2016).

Durante os processos de produção e processamento de produtos alimentícios de origem animal, em especial os de origem láctea, há o contato direto entre os animais e seres humanos, seja na alimentação e cuidado ao animal, na ordenha ou no abate, facilitando a transferência de microrganismos patogênicos, incluindo MRSA, dos humanos para os animais e para os produtos derivados destes animais, que irão abastecer as mesas de milhares de famílias (Ektik *et al.*, 2018).

Além disso, a utilização indiscriminada de antimicrobianos na pecuária também é um fator importante para o surgimento de cepas multidroga resistentes em rebanhos de todo o mundo. Essas substâncias são utilizadas com diversas finalidades, como profilaxia ou tratamento de diversas doenças ou para estimular o crescimento do animal. Vale ressaltar que, além da problemática acerca do aparecimento de cepas resistentes, essa prática também pode gerar resíduos dos antimicrobianos utilizados nos produtos que chegarão ao consumidor final (Hoelzer K *et al.*, 2017; Njoga *et al.*, 2018).



A caracterização fenotípica dos microrganismos como resistentes a diversos antimicrobianos foi, durante anos, a principal forma de se compreender como e onde o fenômeno da resistência acontecia.

Porém, após o advento dos estudos moleculares, outras características puderam ser estudadas e relacionadas à resistência microbiana, como a presença de genes codificadores de proteínas importantes nesse fenômeno. Por exemplo, para que uma cepa de *S. aureus* seja considerada meticilina-resistente, dois aspectos são avaliados: que antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos sejam ineficazes em testes *in vitro* e que esses microrganismos possuem genes ligados à resistência, como o *mecA* (PAPADOPOULOS *et al.*, 2018; GIACINTI *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos estão entre as classes terapêuticas de maior sucesso e mais utilizadas contra infecções bacterianas em todo o mundo. Dentre eles, a meticilina, introduzida na terapêutica a partir da década de 60, foi concebida como uma droga semissintética, com vantagens frente à benzilpenicilina, voltada ao combate de *S. aureus* que já apresentavam características fenotípicas de resistência a outros  $\beta$ -lactâmicos devido a produção de  $\beta$ -lactamases. Essas drogas semissintéticas possuem um radical que as protegem da ação das  $\beta$ -lactamases, porém, cerca de um ano após sua introdução, as primeiras cepas resistentes à meticilina começaram a ser relatadas, demonstrando a grande capacidade plástica do genoma de *S. aureus* em se adaptar à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (Berglund *et al.*, 2009; Enright *et al.*, 2002).

Diferente das demais cepas de *S. aureus*, MRSA têm a capacidade de produzirem uma proteína ligante à penicilina com baixa afinidade às penicilinas semissintéticas (PBP2 ou PB2a), que faz com que essas cepas sejam pouco sensíveis ao tratamento com esses antibióticos (Ammar *et al.*, 2016). Essa proteína é conhecidamente codificada por um gene denominado *mecA*, inserido em um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, chamado “staphylococcal cassette chromosome” (SCCmec), que mostrou-se extremamente capaz de ser transferido entre diferentes cepas de *S. aureus* em decorrência da presença, também, de genes regulatórios (*mecI* e *mecR1*), sequência de inserção e genes codificadores de recombinases, que são responsáveis pela excisão e mobilidade deste elemento genético (Klibi *et al.*, 2018; Ammar *et al.*, 2016; Ma, *et al.*, 2002).

Dentre os genes regulatórios presentes dentro do elemento genético SCCmec, *mecl* é responsável pela repressão do gene *mecA* e *mecR1* é responsável pela codificação da proteína de transcrição de sinal. A transcrição de *mecA* ocorre quando a proteína MecR1 é exposta aos  $\beta$ -lactâmicos com seu domínio extracelular de ligação à penicilina, ativando seu domínio citoplasmático na forma de uma protease. Então, a proteína repressora Mecl é clivada, bloqueando a região do operador do gene *mecA* e expressando PBP2a (López-Vázquez *et al.*, 2015).

Na metade da década passada, percebeu-se que uma cepas de *S. aureus* isolada de alimento apresentava, fenotipicamente, resistência à meticilina, porém, ao se promover um *screening* genético nessa cepa, não se detectava nem a presença do conhecido gene *mecA* e nem de PB2a. Ao se fazer o sequenciamento do genoma desse isolado, revelou-se que essa cepa carregava consigo um homólogo do gene *mecA*, conhecido como *mecC*, com cerca de 69% de similaridade genética a nível de DNA com o gene original e que codificava uma proteína ligante à penicilina com cerca de 63% de similaridade a nível de aminoácidos (Paterson *et al.*, 2013).

Desta forma, percebe-se que a resistência apresentada por *S. aureus* à diversos antimicrobianos, incluindo a meticilina, deve-se a razões multifatoriais, onde duas destacam-se: a produção de  $\beta$ -lactamases (codificadas pelo gene *blaZ*), que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas, e a alteração do sítio de ligação destes antibióticos pela produção de proteína ligadora de penicilina adicional, que somente está presente em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (Zhang *et al.*, 2014; López-Vázquez *et al.*, 2015).

Além destes, também possui importância vários outros genes codificadores e reguladores, que caracterizam a virulência de várias cepas de *S. aureus*, como genes relacionados à síndrome do choque tóxico (*tst*), esfoliatinas (*eta* e *etb*), leucotoxinas (*lukPV*, *lukED* e *lukM*), hemolisinas (*hla*, *hly* e *hld*) e toxinas relacionadas ao inibidor da diferenciação celular epidérmica (EDIN), que podem catalisar a ribosilação de ADP da RhoGTPase, um membro da superfamília de *RassmaliGTPase* de células eucarióticas (Courjon *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

Vários estudos demonstram que cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina já são uma realidade no ambiente agropecuário e trazem à sociedade e às autoridades sanitárias subsídios fortes para que um maior controle e fiscalização dos produtos alimentícios, desde a produção, seja implementado.

Sendo assim, a presente revisão sistemática tem como objetivo compilar as publicações científicas dos últimos 11 anos relacionadas à presença de MRSA em leite e produtos lácteos, nos animais relacionados à produção desses alimentos, assim como nos trabalhadores envolvidos nos processos produtivos do leite, trazendo à comunidade científica fontes confiáveis e atuais relacionadas ao assunto em questão.

## **2. METODOLOGIA**

Realizou-se uma revisão sistemática da literatura sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em leite e alimentos de origem láctea. Os métodos e a condução da revisão sistemática, assim como o processo de identificação, seleção e classificação dos artigos, seguiu a Cochrane Collaboration.

### **2.1. Estratégia de busca para identificação dos artigos**

Foi realizada a pesquisa em quatro grandes bases de dados, de conhecido respaldo e renome científico: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), PUBMED, SCOPUS e Web of Science, selecionando-se artigos científicos publicados entre janeiro de 2007 a abril de 2018, com os descritores “*Staphylococcus aureus* methicillin resistant”, “milk”, “cheese”, “yogurt” e “dairy”, sem restrição do idioma do estudo.

### **2.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos artigos com dados sobre a presença de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em leite e alimentos de origem láctea, além de ambiente e animais de fazendas leiteiras, equipamentos de armazenamento e venda de leite e trabalhadores agropecuários diretamente ligados à produção do leite ou criação dos animais, que explicitassem no título do artigo os descritores “*Staphylococcus aureus* methicillin resistant” AND “milk” OR “cheese” OR “yogurt” OR “dairy”.

Os artigos que preencheram os critérios de inclusão foram analisados na íntegra para se verificar se estavam dentro do tema proposto. Foram excluídos os artigos que não se enquadravam no tema proposto, em que o objeto de estudo foi leite humano, assim como *short communications*, revisões e estudos cujo objetivo era verificar sinergismo entre drogas antimicrobianas.

## **3. RESULTADOS**

Através da pesquisa realizada nas bases de dados selecionadas, 270 artigos científicos foram encontrados com os descritores escolhidos. Ao se utilizar os descritores “*Staphylococcus aureus* AND methicillin AND resistant AND milk”, 25, 27,

43 e 39 artigos foram encontrados, respectivamente nas bases BVS, PubMed, Scopus e Web of Science. Com os descritores “*Staphylococcus aureus* AND methicillin AND resistant AND cheese”, 2, 2, 5 e 4 artigos, respectivamente nas mesmas bases, foram selecionados. Já com os descritores “*Staphylococcus aureus* AND methicillin AND resistant AND dairy”, 24, 27, 39 e 33 artigos, respectivamente, foram selecionados. E, finalmente, com os descritores “*Staphylococcus aureus* AND methicillin AND resistant AND yogurt”, nenhum artigo foi selecionado (Gráfico 1).

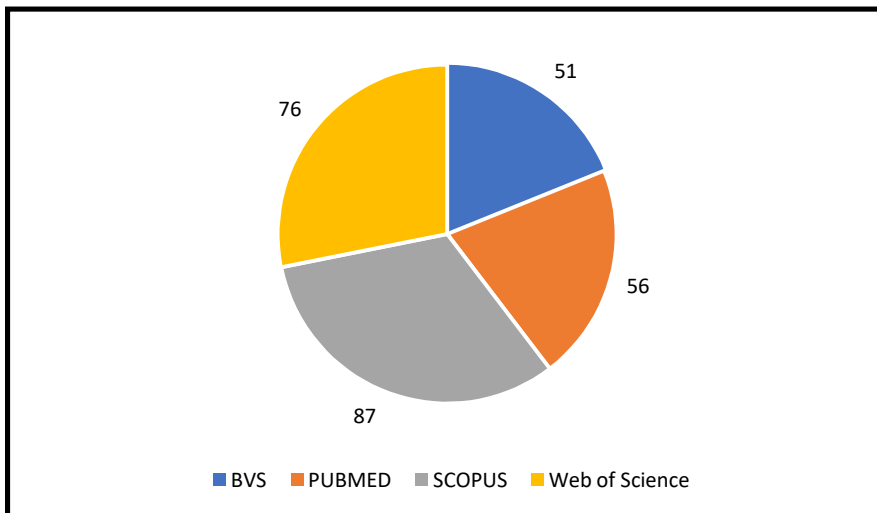


Gráfico 1. Número de artigos encontrados por base de dados pesquisada no período entre janeiro de 2007 e abril de 2018.

Ao se verificar quais artigos estavam repetidos entre as quatro diferentes bases de dados, foram excluídos 195 artigos, remanescendo 75 artigos. Destes, 4 artigos foram retirados por analisarem leite humano, 3 por serem revisões, 7 por serem *short communications*, 1 por ser estudo comparativo de sinergismo de drogas e 2 artigos por abordarem temas distintos dos propostos nesta revisão sistemática. Ao final, um total de 58 artigos foram incluídos nesta revisão (Figura 1)

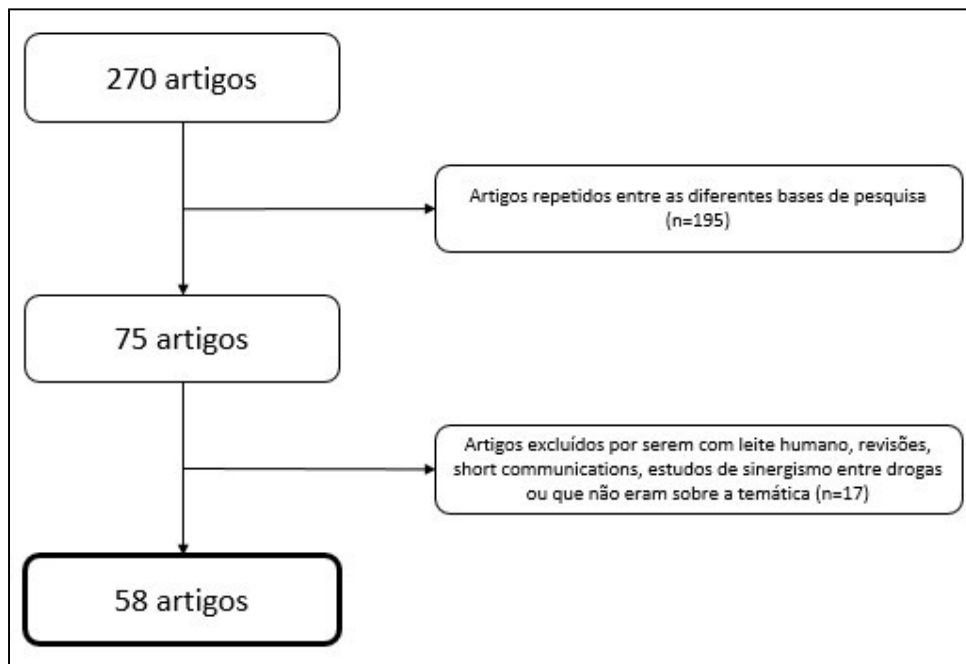


Figura 1. Fluxograma representando o processo de seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática.

### 3.1. Descrição dos estudos

A compilação relacionada aos principais aspectos de cada artigo escolhido está demonstrada na tabela 1. Vinte e nove países foram incluídos nos experimentos dos artigos pesquisados e a maioria dos estudos foi realizada na Itália (14/58; 24,14%), Irã (5/58; 8,62%), Alemanha (4/58; 6,90%) e Paquistão (4/58; 6,90%). Países da Europa foram relacionados à maioria dos estudos (32/58; 55,17%), seguidos de Ásia (18/58; 31,03%), África (6/58; 10,34%) e Américas (4/58; 6,90%).

Após a avaliação dos critérios de exclusão, verificou-se que os artigos publicados nos anos de 2007 a 2009 não se enquadravam nos objetivos desta revisão. Deste modo, a quantidade de estudos selecionados por ano foi: 3 estudos em 2010 (3/58; 5,17%), 4 em 2011 (4/58; 6,90%), 9 em 2012 (9/58; 15,52%), 5 em 2013 (5/58; 8,62%), 7 em 2014 (7/58; 12,07%), 6 em 2015 (6/58; 10,34%), 11 em 2016 (11/58; 18,97%), 9 em 2017 (9/58; 15,52%) e 4 até abril de 2018 (4/58; 6,90%), como mostrado no gráfico 2.

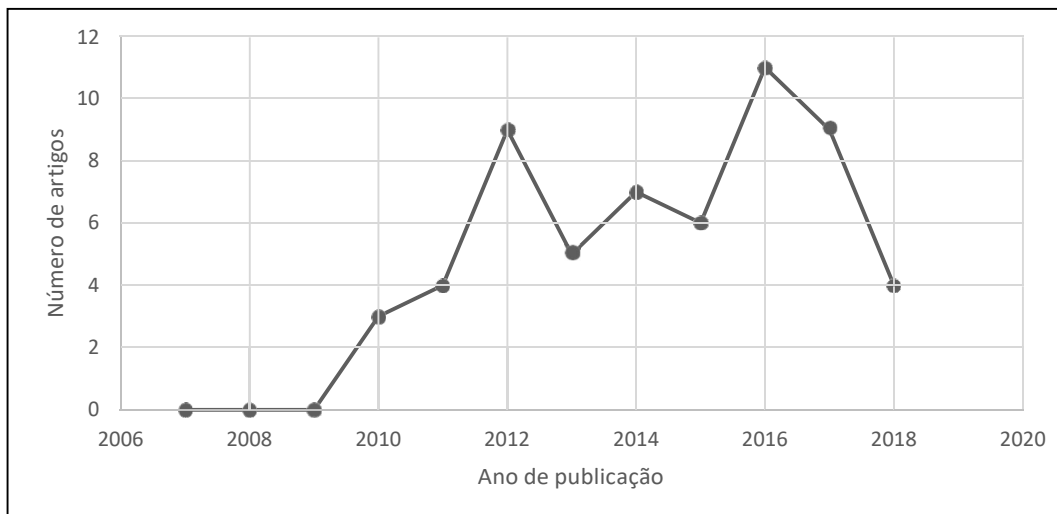


Gráfico 2. Número de artigos selecionados por ano de publicação.

Dentre as amostras analisadas nos estudos, a maior frequência foi em leite de vacas (30/58; 51,72%), seguida de queijo (17/58; 29,31%), gado (13/58; 22,41%), humanas (13/58; 22,41%) e tanques de armazenamento de leite (11/58; 18,97%). Mais de um tipo de amostra foi estudado em diversos artigos, fazendo com que o mesmo artigo possa entrar na porcentagem de mais de um tipo de amostra. Sete tipos diferentes de metodologias foram utilizadas para avaliar o perfil de resistência das cepas MRSA encontradas, sendo a mais utilizada disco-difusão (32/58; 55,17%), seguida por microdiluição em caldo (10/58; 17,24%); difusão em ágar (2/58; 3,45%), E-test (2/58; 3,45%), ágar seletivo (2/58; 3,45%), D-test (1/58; 1,72%) e Vitek (1/58; 1,72%). Testes moleculares foram utilizados em 54 (93,10%) dos 58 artigos selecionados.

As linhagens mais prevalentemente encontradas através da técnica Multi locus sequence typing (MLST) foram ST1 (10/58; 17,24%), ST398 (9/58; 15,52%), ST5 (7/58; 12,07%), ST8 (4/58; 6,90%) e ST97 (4/58; 6,90%), podendo mais de uma linhagem aparecer por artigo, assim como o SCCmectype, em que o tipo IV foi o mais prevalente (17/58; 29,31%), seguido por tipo V (15/58; 25,86%), II (4/58; 6,90%), III (4/58; 6,90%), XI (2/58; 3,45%) e I (1/58; 1,72%). Além disso, a presença do gene *mecC* foi identificada em 4 (6,90%) artigos.

A tipagem molecular para *staphylococcal protein A* (*spa*) também foi estudada em alguns artigos desta revisão. Dentre os tipos mais comumente presentes, t127 (13/58; 22,41%) foi o mais encontrado, aparecendo na Itália (n=10), Brasil (n=1), Grécia (n=1) e Uganda (n=1). Em seguida, o tipo t11 (8/58; 13,79%), que foi

encontrado em estudo na Itália (n=3), Alemanha (n=2), Holanda (n=2) e Bélgica (n=1). Como os terceiros mais prevalentes, temos quatro tipos diferentes: t34, t108, t899 e t1730 (4/58; 6,90%). O tipo t34 foi encontrado na Alemanha (n=2), Itália (n=1) e Holanda (n=1), enquanto t108 estava presente na Holanda (n=2), Bélgica (n=1) e Grã-Bretanha (n=1). Os dois últimos tipos, t899 e t1730 foram encontrados somente na Itália (n=4).

O gene codificador da Proteína de Pantón-Valentine foi encontrado em isolados de 3 estudos (3/58; 5,17%), assim como outros genes codificadores que também foram encontrados, como genes de enterotoxinas (15/58; 25,86%), hemolisinas (3/58; 5,17%), outras leucotoxinas (3/58; 5,17%) e toxina da síndrome do choque tóxico (1/58; 1,72%).

Reference	Country	Samples	Method	MRSA isolates (n)	Comments	MLST ou MLVA (n)	<i>spa</i> type
Al-Ashmawy <i>et al.</i> , 2016	Egypt	Raw milk from cows, Damietta cheese, Kareish cheese, ice cream and yogurt.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	414	Genes encoding $\alpha$ -hemolysin ( <i>hla</i> ) and staphylococcal enterotoxins ( <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> ) were detected in all isolates.	UNVALUED	UNVALUED
Ammar <i>et al.</i> 2016	Egypt	Milk from healthy cows, cows with mastitis and beef.	Susceptibility test by DD and D-test; Typing by MT	20	The study found genes encoding virulence factors such as <i>blaZ</i> and <i>tetK</i> , in addition to <i>mecA</i> .	UNVALUED	UNVALUED
Antoci <i>et al.</i> , 2013	Italy	Dairy cows, humans and bulk tank milk	Susceptibility test by DD; Typing by MT	344	71.5% of the milk isolates were medium producers of biofilm, 28.5% were poor biofilm producers and two milk isolates were positive for the gene encoding toxic shock syndrome toxin.	UNVALUED	UNVALUED
Aqib <i>et al.</i> , 2017	Pakistan	Milk of cows and buffaloes.	Susceptibility test by SM; Typing by MT	306	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Aqib <i>et al.</i> , 2018	Pakistan	Raw milk from cows with mastitis.	Typing by MT	306	When compared to MRSA detection methods, there was a discrepancy of 17.97% between disc-diffusion and <i>mecA</i> detection methods.	UNVALUED	UNVALUED
Arefi <i>et al.</i> , 2014	Iran	White cheese and feta cheese	Susceptibility test by DD; Typing by MT	8	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Asiimwe <i>et al.</i> , 2017	Uganda	Milk from cows, ghee butter and fermented milk	Susceptibility test by DD and E-test; Typing by MT	23	Of the 23 MRSA isolates, 21 (91.3%) were SCCmec type V. Only five isolates showed the virulence gene of PVL.	ST1, ST97, ST121, ST88, ST97,	<b>mecA+</b> : t2112, t127, t14299, t645, t1398, t3992, t7753, t3772; <b>mecA-</b> : t1398, t380, t7753, t1236, t10103, t186, t3992
Azeez <i>et al.</i> , 2013	Pakistan	Milk of cows and buffaloes with mastitis.	Susceptibility test by DD and SM	17	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED



Bao <i>et al.</i> , 2016	Pakistan	Milk of cows.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	5	Eighteen strains of <i>S. aureus</i> contained the <i>mecA</i> gene, but only five were characterized as MRSA. The staphylococcal enterotoxin "a" ( <i>sea</i> ) gene was detected in 18 strains.	UNVALUED	UNVALUED
Bardiau <i>et al.</i> , 2013	Belgium	Raw milk from cows with mastitis.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	19	The identification of SCCmec types identified two types of cassettes: 15 SCCmec type V isolates and 4 SCCmec type IV isolates.	ST398 (18) e ST8 (1)	(ST8) - t008 e (ST398) - t567, t108, t011
Basanisi <i>et al.</i> , 2017	Italy	Milk and dairy products.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	40	All isolates harbored SCCmec type V or IV. Three isolates contained one or more enterotoxin encoding genes. Half of the isolates contained coding genes for PVL.	ST152 (27), ST398 (10), ST1 (2) e ST5 (1)	(ST152) - t355, (ST398) - t899, t108, (ST1) - t127, (ST5) - t688
Benedetti <i>et al.</i> , 2010	Italy	Milk of cows.	Typing by MT	55	Four MRSA were enterotoxigenic and all isolates belonged to SCCmec type IV or V.	ST398 (9), ST1 (3), ST152 (1), ST1476 (1)	(ST398) - t899, t034, t1939; (ST1) - t127; (ST152) - t355; (ST1476) - t1730
Carfora <i>et al.</i> , 2016	Italy	Sheep at the end of lactation, dry sheep, lambs less than 6 months of age and human samples of workers.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	9	All isolates suspected of MRSA were positive for <i>mecA</i> and <i>blaZ</i> genes, but negative for <i>mecC</i> gene.	ST1 (10)	(ST1) - t127
Caruso <i>et al.</i> , 2016	Italy	Bulk tank of sheep and goat's milk and nasal swabs of farm workers	Susceptibility test by DD; Typing by MT	5	The SCCmec typing revealed SCCmec type IV or V in all MRSA isolates.	ST398 (4) e ST1 (1)	(ST398) - t1255 e (ST1) - t127
Chaalal <i>et al.</i> , 2014	Algeria	Milk of cows, chicken and beef.	Susceptibility test by DD; Typing by Biochemistry	2	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED
Chu <i>et al.</i> , 2012	Taiwan	Goats and farm environment.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	11	Of the nine enterotoxin genes examined, only sec and see were identified. PCR amplification of 11 MRSA isolates identified SCCmec type	ST59	UNVALUED

Author	Country	Sample Source	Method	n	Findings	STs	Other
Cortimiglia <i>et al.</i> , 2016	Italy	Bulk tank milk	Susceptibility test by BM; Typing by MT	32	III in nine isolates and SCCmec type II in two isolates.  The MLST showed that the majority (28/32) of the isolates belonged to the typical strains associated with cattle: ST398, ST97 and ST1. All strains harbor SCCmec type IV or V cassettes.	ST398 (14), ST97 (7), ST1 (7), ST5 (2), ST461 (1), ST3211 (1)	(ST398) - t899, t034, t011, t108; (ST97) - t1730, t4795, t2421, t9295; (ST1) - t127; (ST5) - t535, t548; (ST461) - t688; (ST3211) - t309
Ektik <i>et al.</i> , 2017	Turkey	Milk of cows, white cheeses, kashar, tulum, sepet, mihalic and curd, butter and yogurt.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	1	Seventeen isolates were confirmed as <i>S. aureus</i> by detection of the <i>nuc</i> gene and one as MRSA carrying the <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Feltrin <i>et al.</i> , 2015	Italy, Germany and Spain	Cattle, pigs and humans.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	40	All isolates showed SCCmec type V or SCCmec type III and were positive for leukotoxin and hemolysin encoding genes.	ST97 (41), ST71 (3), ST352 (3)	(ST97) - t4795, t1730, t1236, t2112, t267, t345, t3992, t5487 e t426; (ST71) - t524; (ST352) - t359 e t267
Feßler <i>et al.</i> , 2012	Netherlands	Milk of cows, cows, calves, environment dust for raising pigs and calves, dogs, horses, sheep and humans.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	125	The SCCmec typing revealed SCCmec type IV in 48 isolates and SCCmec type V in 67 isolates.	ST398 (125)	t011, t108, t034, t184, t2287, t567, t1451, t3934
Friedrich <i>et al.</i> , 2011	Germany	Milk of cows.	Typing by MT	4	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED
Ganai <i>et al.</i> , 2016	India	Raw milk from cows, buffaloes and goats with mastitis.	Typing by MT	15	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED

Giacinti <i>et al.</i> , 2017	Italy	Sheep milk storage tanks	Susceptibility test by BM; Typing by MT	2	One MRSA isolate was positive for <i>mecA</i> and another for <i>mecC</i> . The <i>mecC</i> positive isolate did not show any enterotoxin encoding genes, whereas the <i>mecA</i> positive showed the <i>seh</i> gene.	ST1 (1) e ST130 (1)	(ST1) - t127 e (ST130) - t843
Gonzalez <i>et al.</i> , 2017	Brazil	Minas Frescal cheese	Susceptibility test by DD; Typing by MT	7	All MRSA strains were positive for the <i>mecA</i> gene and two of them carried enterotoxin genes.	ST72 (3), ST5 (2), ST1 (1) e ST4304 (1)	(ST72) - t2703, UN; (ST5) - t568, UN; (ST1) - t127, (ST4304) - UN
Haran <i>et al.</i> , 2012	USA	Bulk tank milk	Susceptibility test by BM; Typing by MT	2	Seven <i>S. aureus</i> isolates, including two MRSA isolates, produced staphylococcal B, C, D and E enterotoxins in overnight cultures.	ST5 (1) e ST8 (1)	(ST5) - cepa desconhecida e (ST8) - t121
Hata <i>et al.</i> , 2010	Japan	Milk of cows.	Typing by MT	4	The SCCmec typing revealed SCCmec type II in all MRSA isolates.	CC5, ST5 (MRSA)	t001, t002 e t375 (MRSA)
Klibi <i>et al.</i> , 2018	Tunisia	Raw milk from cows with mastitis.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	3	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> and <i>blaZ</i> genes and carried the enterotoxin <i>sen</i> gene. Four isolates of Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) contained the toxin 1 gene of toxic shock syndrome ( <i>tst</i> ). Thirty-three isolates contained SCCmec type V, while 2 isolates carried type III and 1 type IVa. However, the	ST4120 (2) e ST4114 (1)	(ST4120) - t267 e (ST4114) - t10381
Kreausukon <i>et al.</i> , 2012	German	Bulk tank milk.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	36	microarray confirmed the presence of <i>ccrC</i> gene and the absence of <i>ccrA3</i> and <i>ccrB3</i> in the two strains that were attributed to SCCmec type III. This indicates that they are V type variants.	CC398 (36)	t011, t034
Lim <i>et al.</i> , 2013	South Korea	Milk of cows, agricultural environment and farmers.	Typing by MT	45	All isolates were classified as PVL negative.	ST72 (42)	(ST72) - t324

Locatelli <i>et al.</i> , 2017	Italy	Milk and nasal swabs from cows, nasal swabs of pigs and humans and environmental dust.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	36	Most of the isolates were negative for enterotoxin genes and positive to <i>fmtb</i> gene, with exception of ten CC97 isolates. All isolates were positive for <i>lukE</i> and <i>cna</i> genes.	CC398 (30), CC97 (24) e CC1 (9)	(CC398) - t899, t011; (CC97) - t1730, t4798; (CC1) - t127, t321
López-Vázquez <i>et al.</i> , 2015	Mexico	Milk of cows.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	4	The <i>blaZ</i> gene was identified in 38 isolates (44.7%). Four isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> harbored <i>mecA</i> gene. One of these was positive for <i>mecI</i> and <i>mecR1</i> genes.	UNVALUED	UNVALUED
Luini <i>et al.</i> , 2015	Italy	Milk of cows.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	15	Fifteen strains carried <i>mecA</i> , but none was positive for <i>mecC</i> . The SCCmec cassettes were classified as type IV, type V or type IV/V.	CC398 (10), CC97 (2), CC1 (2), CC8( 1)	(CC398) - t899, t14644; (CC97) - t1730; (CC1) - t127; (CC8) - t3092
Macori <i>et al.</i> , 2017	Italy	Sheep dairy farms with artisanal dairy facilities with a history of MRSA presence.	Typing by MT	27	Forty-one isolates tested positive for at least one staphylococcal enterotoxin gene. The PVL exotoxin gene was detected in a MRSA strain isolated from bulk tank milk, which tested negative for SE genes.	UNVALUED	t127, t2678, t044, t1166, t1773
Mausam <i>et al.</i> , 2016	India	Milk of cows.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	44	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Mirzaei <i>et al.</i> , 2011	Iran	Raw milk, pasteurized milk, ice cream and cheeses.	Typing by MT	4	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Mirzaei <i>et al.</i> , 2012	Iran	Raw milk, Pasteurized milk from cows and ice cream.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	20	A total of 69 isolates were positive for the <i>nuc</i> gene and of these, 20 isolates showed the <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Mirzaei <i>et al.</i> , 2012	Iran	White cheese and butter.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	11	From a total of 30 isolates containing the <i>nuc</i> gene, eleven presented the <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Mohammed <i>et al.</i> , 2018	Tanzania	Milk of cows.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	3	Only 1 positive strain of <i>mecA</i> was considered typifiable and belonged to <i>spa</i> type t2603.	UNVALUED	t2603

Nusrat <i>et al.</i> , 2015	Bangladesh	Raw milk from cows and cheeses.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	10	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED
Oliveira <i>et al.</i> , 2016	Brazil	Milk of cows and swabs of hands of milkers.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	22	Of the 104 isolates tested for <i>blaZ</i> gene, 23 were positive. In 16 strains, seven positive isolates were found for <i>mecA</i> and <i>blaZ</i> , 10 positive for <i>mecA</i> , but negative for <i>blaZ</i> , two positive for <i>blaZ</i> , but negative for <i>mecA</i> and four did not carry any of them.	ST97 (4), ST126 (3), ST6 (1), ST1 (1), ST1583 (1), ST5 (1), ST83 (1), ST1622 (1), ST1623 (1), ST1624 (1) e ST1625 (1)	UNVALUED
Pamuk <i>et al.</i> , 2012	Turkey	Cheeses with aged skin, cream of buffaloes milk and milk of buffaloes Milk storage tank for cows, sheep and goats, dairy products (cheese, yogurt and butter), humans, cows, sheep, goats and equipment.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	9	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2018	Greece		Susceptibility test by AD; Typing by MT	11	All MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	t127, t3586, t1773, t4038
Parisi <i>et al.</i> , 2016	Italy	Bulk tank milk	Susceptibility test by DD; Typing by MT	12	All isolates were negative for PVL and positive for <i>icaA</i> . Fifty-eight percent of the strains showed enterotoxin encoding genes.	ST1 (3), ST8 (2), ST398 (2), ST5 (1), ST45 (1), ST71 (1), ST88 (1), ST2781 (1)	(ST1) - t174, t127; (ST8) - unknown, (ST398) - t899, t011; (ST5) - t688; (ST45) - t015; (ST71) - t524; (ST88) - t786; (ST2781) - t1730
Paterson <i>et al.</i> , 2014	Great Britain	Bulk tank milk	Susceptibility test by DD; Typing by MT	11	All ten <i>mecC</i> -positive MRSA were negative in slide agglutination and in three commercially available assays for detection of penicillin binding protein 2a.	<i>mecC</i> -positivos: ST425 (7); CC130 - ST2573 (2);	(ST425) - t6292, t742 e t6300; (ST130) - t843; (ST2573) - t843.

						<i>mecA</i> -positivo: ST398	
Ponnusamy <i>et al.</i> , 2015	India	Milk cow's eyes with bilateral corneal ulceration, lymph node enlargement and bruxism	Susceptibility test by DD	1	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED
Riva <i>et al.</i> , 2015	Italy	Bulk tank milk and milk vending machines	Susceptibility test by DD; Typing by MT	7	Characterization of the SCCmec genes showed that the strains harbored SCCmec I, II, IV or V type cassettes. Sixteen isolates had at least one staphylococcal enterotoxin encoding gene.	UNVALUED	UNVALUED
Ronco <i>et al.</i> , 2017	Denmark	Dairy cow with mastitis.	Typing by MT	1	The <i>mecA</i> gene and a wide range of other resistance genes ( <i>blaZ</i> , <i>ermB</i> , <i>lnuB</i> , <i>norA</i> , <i>tetK</i> and <i>tetM</i> ) were found.	ST398	UNVALUED
Salehi <i>et al.</i> , 2012	Iran	Raw milk from cows, cheese and ice cream.	Identification by Biochemistry	7	UNVALUED	UNVALUED	UNVALUED
Schlotter <i>et al.</i> , 2014	Germany	Milk of Simmental cows, heifers, bulls, calves and humans.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	18	All MRSA isolates were assigned to CC130, agr group III and had capsule type 8. All 18 isolates were negative for <i>mecA</i> but harbored <i>mecC</i> and the $\beta$ -lactamase gene associated with <i>blaZ</i> -SCCmec XI. All isolates harbored the <i>hlg</i> locus ( <i>hlgA</i> , <i>lukF/S</i> ) and leukocidin <i>lukD</i> gene homologue, whereas <i>lukE</i> showed variable, weak or negative results.	CC130	UNVALUED
Song <i>et al.</i> , 2016	South Korea	Raw milk from cows with mastitis.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	23	All MRSA isolates were positive for staphylococcal enterotoxin genes. The SCCmec typing revealed SCCmec type IV and type II in isolates found.	UNVALUED	t324, t148, t002

Spohr <i>et al.</i> , 2011	German	Bulk tank milk, nasal swabs of workers and livestock and swine environments.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	38	All isolates that were evaluated for SCCmec typing were identified as type V.	UNVALUED	t011 e t034
Tu'rkylmaz <i>et al.</i> , 2010	Turkey	Milk of cows.	Susceptibility test by AD; Typing by MT	16	All strains resistant to tetracycline and gentamicin contained the gene <i>tetM</i> and <i>aac(6)-aph(2)</i> , respectively. Among the macrolide-resistant isolates, nine were positive to <i>ermA</i> and seven to <i>ermA</i> and <i>ermB</i> genes.	ST8 (1) e ST239 (2)	(ST8) - t190 e ST239 - t030
Unnersted <i>et al.</i> , 2013	Sweden	Milk of cows.	Susceptibility test by BM; Typing by MT	58	In four of the isolates, <i>mecC</i> gene was detected.	ST130 (3) e ST425 (1)	(ST130) - t524 e (ST425) - t9111
van Duijkeren <i>et al.</i> , 2014	Netherlands	Skin between the udder and the hind paw of cow	Typing by MT	16	All MRSA isolates belonging to the cattle-associated CC398 complex were PVL-negative and <i>spa</i> type t011 was predominant.	MT0398-MC0398 (11), MT0572-MC0398 (1), MT0567-MC0398 (3) e MT0564-MC0398 (1)	(MT0398-MC0398) - t11, (MT0572-MC0398) - t108, (MT0567-MC0398) - t567, t588, (MT0564-MC0398) - t1457
Visciano <i>et al.</i> , 2014	Italy	Bulk milk from cows, environmental dust and conjunctival and nasal swabs from dairy farm workers.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	7	Five MRSA strains were positive for <i>mecA</i> gene.	UNVALUED	UNVALUED
Vylet'elov' a <i>et al.</i> , 2011	Czech Republic and Slovakia	Milk from Dutch cows, goats and sheep and human swab.	Susceptibility test by DD; Typing by MT	23	Positive results from the presence of <i>mecA</i> gene and negative results from presence of any other genes analyzed (PVL, <i>tst</i> ) were identical in all strains tested and SCCmec was classified as type IV or V.	UNVALUED	UNVALUED
Zhang <i>et al.</i> , 2014	China	Confirmed staphylococcal food poisoning and milk from cows with mastitis.	Susceptibility test by E-test; Typing by MT	41	95.1% of isolates were positive for, at least, one staphylococcal enterotoxin gene.	UNVALUED	UNVALUED

---

Zutic <i>et al.</i> , 2012	Serbia	Raw milk from cows with mastitis.	Susceptibility test by Vitek2; Typing by MT	12	All isolates showed MRSA SCCmec type IV or V.	UNVALUED	UNVALUED
----------------------------	--------	-----------------------------------	---	----	---	----------	----------

---



#### 4. DISCUSSÃO

O leite é um dos alimentos mais antigos da humanidade e suas múltiplas formas de transformação o fizeram um ingrediente extremamente versátil para diversas culturas. Dentre elas, destaca-se a cultura italiana, onde a preparação de massas a base de leite, farinha, ovos e fermento se tornou tão popular que se disseminou pelo mundo. Provavelmente, por esse motivo, a grande maioria dos estudos encontrados, relacionados à presença de MRSA em leite e produtos lácteos, tenha sido nesse país, com 24,14% das publicações. Durante o período avaliado nesta revisão, percebe-se que a quantidade de estudos relacionados à MRSA e produtos lácteos vem aumentando, o que demonstra a crescente importância do tema tanto para a comunidade científica quanto para as autoridades ligadas à agropecuária e à saúde pública.

A criação extensiva e intensiva de gado em grandes fazendas produtoras, seja de gado leiteiro ou de corte, deixou de ser somente por monocultura e passou a compartilhar espaços com outros tipos de criações, como de suínos, caprinos e ovinos. Deste modo, o surgimento de linhagens MRSA em animais que anteriormente não eram comuns, está se tornando usual (Spohr *et al.*, 2011; Feltrin *et al.*, 2015; Papadopoulos *et al.*, 2018). Essa transferência de microrganismos entre as diversas culturas dos processos produtivos pode favorecer o aparecimento de cepas resistentes, já que podem ocorrer fenômenos de troca de informações genéticas entre os novos microrganismos e a microbiota residente.

A presença do gene *mecA*, assim como do gene *mecC*, é uma característica importante para a definição de uma cepa de *S. aureus* ser considerada resistente à meticilina. Esse gene é o responsável pela expressão de proteína ligante à penicilina com baixa afinidade às penicilinas semissintéticas como a meticilina e está localizado dentro de um elemento genético chamado SCCmec, que pode ser subdividido em tipos que variam de I a XI (Riva *et al.*, 2015; Klibi *et al.*, 2018).

Vários estudos demonstram que o tipo de elemento genético SCCmec é importante para a resistência microbiana demonstrada pelos isolados MRSA. Em alguns, foi constatado que SCCmec tipos I, IV, V, VI e VII usualmente favoreciam a resistência das cepas somente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, enquanto os tipos II e III eram característicos de cepas multirresistentes, em decorrência de plasmídios e transposons contendo genes de resistência que se integravam ao SCCmec (De Lencastre *et al.*, 2007; McKay, 2008).

Alguns dos estudos incluídos nessa revisão sistemática corroboram esse achado, relacionando, principalmente, os tipos SCCmec IV e V à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Vyletřlová *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Asiimwe *et al.*, 2017). Porém, em outros estudos, o tipo de cassete não influenciou de forma crucial à caracterização do perfil de resistência, demonstrando que esse fator é multifatorial e que não há como levar somente essa característica em consideração. (Zutic *et al.*, 2012; Cortimiglia *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Sendo assim, os resultados dos estudos levam a crer que relacionar a resistência às penicilinas e cefalosporinas é algo que deve ser feito após testes complementares, como estudos de sensibilidade *in vitro*, presença de proteína ligante à penicilina de baixa afinidade, além de métodos moleculares de expressão gênica.

Em países com oltália, Brasil e Uganda, a linhagem ST1, mais prevalente dentre as citadas nos estudos desta revisão, vem sendo encontrada principalmente em humanos e tanques de armazenamento de leite de gado (e alimentos lácteos), sendo responsável por muitos casos de mastite em vacas leiteiras e, esporadicamente, apresentando-se como contaminantes em amostras de leite de cabras (Carfora *et al.*, 2016; Cortimiglia *et al.*, 2016).

Cepas desta linhagem, encontradas em muitos estudos que as relacionam com contaminação animal, são conhecidamente causas de infecções nosocomiais importantes, causadas, muitas vezes, pela produção de biofilmes em dispositivos médico-hospitalares como cateteres. Essa produção está diretamente associada à disfunção do gene *agr* (accessory gene regulator), presente no locus gênico de mesmo nome, e importante na regulação da formação, desenvolvimento e quorum sensing destes biofilmes e outros fatores de virulência. Sendo assim, sugere-se que estratégias terapêuticas moleculares de inativação deste gene não teriam a eficácia desejada, pois a disfunção deste gene estimula a produção do biofilme (Archer *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013)

*S. aureus* ST1, assim como ST5, também foram relacionados com a produção de enterotoxinas estafilocócicas em intoxicações alimentares (Fetsch *et al.*, 2014). Essas toxinas (*Staphylococcaltoxins – SE*) são codificadas por genes já conhecidos (*sea*, *seb*, *sec*, *see*, *seh*, *sek*, dentre outros) e possuem papel importante na patogênese das intoxicações alimentares, já que possuem estabilidade térmica, requerendo temperatura em torno de 100 °C por 5-10 minutos para sua inativação, e resistência a enzimas proteolíticas (Gonzalez *et al.*, 2017).

Essas enterotoxinas estafilocócicas são produzidas majoritariamente por *Staphylococcus* coagulase-positivo. Em decorrência a resistência térmica, essas toxinas tornam-se importantes fatores nas doenças transmitidas por leite cru e produtos lácteos não pasteurizados, já que, na maioria dos casos, a pasteurização é suficiente somente para eliminar os microrganismos produtores, sem eficientemente inativar as enterotoxinas. Dentre as enterotoxinas estafilocócicas, a do tipo C é a mais comumente produzida por *S. aureus* isolados de animais produtores de leite (Zhang *et al.*, 2014; Riva *et al.*, 2015; Al-Ashmawy *et al.*, 2016).

Estudos relacionados à contaminação por MRSA em leite, produtos lácteos, animais produtores e equipamentos envolvidos no processo produtivo, mostram que a presença de cepas SE-positivas é comum em ambientes como esses em diversos países do mundo, como Taiwan (Chu *et al.*, 2012), China (Zhang *et al.*, 2014), Itália (Riva *et al.*, 2015), Paquistão (Bao *et al.*, 2016) e Brasil (Gonzalez *et al.*, 2017). A presença dessas cepas pode ser extremamente preocupante em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde problemas relacionados a higiene dos alimentos ainda fazem parte do cotidiano da população.

Também presente na Itália, no Brasil e em Uganda, a linhagem ST97, encontrada em diversos estudos, está tipicamente relacionada a rebanhos de gado e suínos, sendo um importante agente contaminante de alimentos de origem. Essa linhagem já demonstrou ser bastante heterogênea no que se refere à resistência microbiana, sendo relacionada à multidroga resistência (Feltrin *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016; Cortimiglia *et al.*, 2016; Asiimwe *et al.* 2017).

O segundo tipo de cepa mais prevalente, ST398, notadamente é um agente infeccioso relacionado ao ambiente agropecuário. Porém, está cada vez mais frequentemente sendo causadora de infecções humanas (Larsen *et al.*, 2015). Encontrada em vacas leiteiras com mastite, seus leites e produtos lácteos, além de tanques de armazenamento, o carreamento desse microrganismo através de produtos alimentares para seres humanos pode ser fator fundamental para o incremento dessas infecções (Benedetti *et al.*, 2010; Feßler *et al.*, 2012; Bardiau *et al.*, 2013; Parisi *et al.*, 2016).

Todos os isolados MRSA que Klibi *et al.* (2018) encontraram em amostras de leite de vacas com mastite foram considerados *agr*-type I, que possuem grande capacidade de invasão em células epiteliais e conseguem persistir em glândulas mamárias, fato esse

que sugere que esse tipo de isolado seja o principal causador de mastite bovina clínica ou subclínica e tendo outros subtipos relacionados a infecções humanas (Antoci *et al.*, 2013).

Outro locus envolvido na formação de biofilmes por cepas de *S. aureus* é o de adesão intercelular (*ica*), em que seus genes e produtos têm, em sua regulação, a forte ação de componentes ambientais como o crescimento anaeróbico (comum no microambiente do biofilme), presença de compostos como glicose e etanol, osmolaridade, temperatura e presença de antibióticos, como a tetraciclina (Fitzpatrick *et al.*, 2005; Archer *et al.*, 2011).

Para diversas finalidades, a utilização de antimicrobianos na criação extensiva de gado, seja de corte ou leiteiro, já demonstrou haver consequências relacionadas à resistência bacteriana e a tetraciclina e seus derivados estão entre os antimicrobianos mais utilizados (Katakweba *et al.*, 2012; Van Boeckel *et al.*, 2015). Sendo assim, pode-se sugerir um favorecimento à produção de biofilmes por cepas de *S. aureus* *ica*-positivas em fazendas de gado cuja utilização irresponsável de antimicrobianos, como a tetraciclina, é uma prática usual.

Em um estudo realizado na Itália, com amostragem de tanques de armazenamento de leite, Parisi *et al.* (2016) encontraram, dentre 365 isolados de *S. aureus*, 12 cepas resistentes à metilicina positivas para o gene *icaA*, porém, negativas para a produção de uma importante citotoxina chamada leucocidina Panton-Valentine (PVL), associada à necrose tecidual e destruição leucocitária pela formação de poros na membrana citoplasmática, codificada pelos genes *lukF-PV* e *lukS-PV* (Löffler *et al.*, 2010). Dentre os estudos avaliados, a presença de isolados MRSA PVL-positivos foi relatada somente em três artigos (3/58; 5,17%), demonstrando que essa característica não é muito comum em cepas relacionadas à produção leiteira e de produtos correlatos. O estudo desenvolvido por Basanisi *et al.* (2017) foi o que encontrou um maior percentual de cepas PVL-positivas dentre os isolados analisados, cerca de 50%, sendo esses todos pertencentes à linhagem ST152.

Segundo Benedetti *et al.* (2010), o genótipo ST152 é associado a infecções humanas, assim como vários outros genótipos bastante encontrados nos mais diversos processos infecciosos. Dentre esses genótipos, temos, além do ST152 e ST1, o ST72 e ST5, estando, este último, também relacionado a rebanhos suínos e bovinos, possuindo a capacidade, segundo Hau *et al.* (2018), de aderir *in vitro* aos queratinócitos humanos.

As informações já conhecidas acerca das linhagens relacionadas aos produtos lácteos mostram que elas possuem características bem definidas relacionadas à forma de contaminação dos produtos, às interações com os seres humanos nas infecções causadas por elas, à produção de toxinas e também em quais tipos de alimentos e animais cada uma delas é mais prevalente. Essas informações são de grande valia no controle das contaminações e infecções causadas por MRSA.

## 5. CONCLUSÃO

Sendo assim, ao se verificar a presença de cepas comumente relacionadas aos animais produtores de leite em seres humanos, causando infecções, deve-se perceber que, cada vez mais, são necessárias medidas sanitárias urgentes para garantir que os produtos lácteos que chegam à mesa da população não sejam transmissores dos agentes etiológicos desses processos infecciosos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Ashmawy, M., Sallam, K., Abd-Elghany, S., Elhadidy, M., Tamura, T.(2016).

Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy Products. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13, 156-162. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2038>.

Ammar, A.M., Attia, A.M., Abd El-Hamid, M.I., El-Shorbagy, I.M., Abd El-Kader, S.A.

(2016). Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cellular and Molecular Biology*. 62, 7-15.

Andrade-Figueiredo, M., Leal-Balbino, T.C. (2016). Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil.

*BMC Microbiology*. 16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>.

Antoci, E., Pinzone, M. R., Nunnari, G., Stefani, S., Cacopardo, B., (2013). Prevalence

and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Among Subjects Working on Bovine Dairy Farms. *Le Infezioni in Medicina*. 2, 125-129.

Aqib, A. I., Ijaz, M., Anjum, A. A., Malik, M. A. R., Mehmood, K., Farooqi, S. H., Hussain, K., (2017). Antibiotic susceptibilities and prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine milk in Pakistan. *Acta Tropica*. 176, 168-172. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.008>.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E., (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2, 445-459. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.

Arefi, F., Mohsenzadeh, M., Razmyar, J., (2013). Isolation, antimicrobial susceptibility and *mecA* gene analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iranian white cheeses. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 15, 127-131. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2014.2351>.

Asiimwe, B. B., Baldan, R., Trovato, A., Cirillo, D. M., (2017). Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. *BMC Infectious Diseases*. 17, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2524-4>.

Azeez, Q., Sajjad-ur-Rahman, Waheed, U., Ismail, M., Ali, R., Ali, T., (2013). Application of nitrocefin test for the direct detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk samples. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*. 11, 96-101.

Bao, H., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L., Wang, R., (2016). Prevalence, enterotoxin gene and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical healthy dairy cows. *Pakistan Veterinary Journal*. 36, 270-274.

Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J. N., Taminiau, B., Mainil, J. G., Ote, I., (2013). Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus*

*aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*. 57, 181-186. <https://doi.org/10.1111/lam.12099>.

Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., La Salandra, G., (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiology*. 62, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.020>.

Benedetti, V., Cremonesi, P., Ferrari, S., Castiglioni, B., Fabbi, M., Vicari, N., Garbarino, C., Battisti, A., Franco, A., Feltrin, F., Luini, M., (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bovine milk samples. *Large Animal Review*. 16, 67-70.

Berglund, C., Ito, T., Ikeda, M., Ma, X. X., Söderquist, B., Hiramatsu, K., (2008). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52, 3512-3516. <https://doi.org/10.1128/AAC.00087-08>.

Carfora, V., Giacinti, G., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Alba, P., Feltrin, F., Sorbara, L., Amoroso, R., Caprioli, A., Amatiste, S., Battisti, A., (2016). Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *Journal of Dairy Science*. 99, 4251-4258. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10912>.

Caruso, M., Latorre, L., Santagada, G., Fraccalvieri, R., Miccolupo, A., Sottili, R., Palazzo, L., Parisi, A., (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. *Small Rumin. Res*. 135, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.023>.

Chaalal, W., Aggad, H., Mebrouk, K., Saidi, N., (2014). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Meat and Bovine Milk in Algeria, *Advances in Environmental Biology*. 8. 1-5.

Chu, C., Yu, C., Lee, Y., Su, Y., (2012). Genetically divergent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and sec-dependent mastitis of dairy goats in Taiwan. *BMC Vet Res*, 8, 39. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-39>.

Cortimiglia, C., Luini, M., Bianchini, V., Marzagalli, L., Vezzoli, F., Avisandi, D., Bertoletti, M., Ianzano, A., Franco, A., Battisti, A., (2016). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in Lombardy Region (Northern Italy). *Epidemiol. Infect.* 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001576>.

Courjon, J., Munro, P., Benito, Y., Visvikis, O., Bouchiat, C., Boyer, L., Doye, A., Lepidi, H., Ghigo, E., Lavigne, J.-P., Vandenesch, F., Lemichez, E., (2015). EDIN-B Promotes the Translocation of *Staphylococcus aureus* to the Bloodstream in the Course of Pneumonia. *Toxins (Basel)*. 7, 4131–4142. <https://doi.org/10.3390/toxins7104131>.

de Lencastre, H., Oliveira, D., Tomasz, A., (2007). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.003>.

Dodémont, M., Argudín, M.A., Willekens, J., Vanderhelst, E., Pierard, D., Miendje Deyi, V.Y., Hanssens, L., Franckx, H., Schelstraete, P., Leroux-Roels, I., Nonhoff, C., Deplano, A., Knoop, C., Malfroot, A., Denis, O., (2018). Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. *J. Cyst. Fibros.* <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.04.008>.

Ektik, N., Gokmen, M., Çibik, R., (2017). The Prevalence and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Milk and Dairy Products in Balıkesir, Turkey. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 68, 613–620. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.85B1.13846>.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>.



Feltrin, F., Alba, P., Kraushaar, B., Ianzano, A., Argudín, A., Matteo, D., Porrero, M.C., Aarestrup, F.M., Butaye, P., Alessia, F., Battisti, A., (2016). *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 97 Lineage Spreading in Dairy Cattle and Pigs in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 816–821. <https://doi.org/10.1128/AEM.02854-15>. Editor.

Ferreira, F., Rodrigues Souza, R., Moraes, B., Maria de Amorim Ferreira, A., Américo, M., Fracalanza, S., Couceiro, J.N., Figueiredo, A., (2013). Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV, *BMC microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-93>.

Feßler, A.T., Olde Riekerink, R.G.M., Rothkamp, A., Kadlec, K., Sampimon, O.C., Lam, T.J.G.M., Schwarz, S., (2012). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Vet. Microbiol.* 160, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.005>.

Fetsch, A., Contzen, M., Hartelt, K., Kleiser, A., Maassen, S., Rau, J., Kraushaar, B., Layer, F., Strommenger, B., (2014). *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream, *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.017>.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O’Gara, J., (2006). The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect, Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01274.x>.

Friedrich, A., Rau, J., Horlacher, S., Spohr, M., (2011). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in milk from dairy farms in Northern Württemberg [Verbreitung von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) in Tankmilch und Mastitismilchproben aus Nord-Württemberg], *Tierärztliche Umschau*. 66, 195-200.

Ganai, A.W., Kotwal, S.K., Wani, N., Malik, M.A., Jeelani, R., Kour, S., Zargar, R., (2016). Detection of *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. *Indian J. Anim. Sci.* 86, 508–511.

Giacinti, G., Carfora, V., Caprioli, A., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Amoruso, R., Iurescia, M., Stravino, F., Dottarelli, S., Feltrin, F., Franco, A., Amatiste, S., Battisti, A., (2017). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep farms in central Italy. *J. Dairy Sci.* 100, 7857–7863.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12940>.

Gonzalez, A.G.M., Marques, L.M.P., Gomes, M. da S.A., Beltrão, J.C. do C., Pinheiro, M.G., Esper, L.M.R., Paula, G.R. de, Teixeira, L.A., Aguiar-Alves, F., (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx232>.

Haran, K.P., Godden, S.M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J.B., Sreevatsan, S., (2012). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol.* 50, 688–695.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.05214-11>.

Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M., (2010). Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Bovine Milk and Their Relevance to Methicillin-Resistant Isolates from Humans. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2130–2139. <https://doi.org/10.1128/JCM.01940-09>.

Hau, S.J., Kellner, S., Eberle, K.C., Waack, U., Brockmeier, S.L., Haan, J.S., Davies, P.R., Frana, T., Nicholson, T.L., (2017). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type (ST) 5 Isolates from Health Care and Agricultural Sources Adhere

Equivalently to Human Keratinocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02073-17.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02073-17>.

Higurashi Y., Okuzumi K., (2000). Detection methods for drug-resistant bacteria in routine examination—MRSA. *Rinsho Byori.* 111, 40-7.

Hoelzer, K., Wong, N., Thomas, J., Talkington, K., Jungman, E., Coukell, A., (2017). Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Vet. Res.* 13, 211.  
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1131-3>.

Katakweba, A.A.S., Mtambo, M.M.A., Olsen, J.E., Muhairwa, A.P., (2012). Awareness of human health risks associated with the use of antibiotics among livestock keepers and factors that contribute to selection of antibiotic resistance bacteria within livestock in Tanzania. *Livest. Res. Rural Dev.* 24.

Klibi, A., Jouini, A., Gómez, P., Slimene, K., Ceballos, S., Torres, C., Maaroufi, A., (2018). Molecular Characterization and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates of Milk of Cows with Clinical Mastitis in Tunisia. *Microb. Drug Resist.* 00, mdr.2017.0278.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0278>.

Kreusikon, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Müller, K., Krömker, V., Zessin, K.-H., Käsbohrer, A., Tenhagen, B.-A., (2012). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95, 4382–4388. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5198>.

Larsen, J., Petersen, A., Sørum, M., Stegger, M., Van Alphen, L., Valentiner-Branth, P., Knudsen, L.K., Larsen, L.S., Feingold, B., Price, L.B., Andersen, P.S., Larsen, A.R., Skov, R.L., (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Eurosurveillance.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.37.30021>.

Leke, A., Goudjil, S., Mullie, C., Grognet, S., Biendo, M., (2017). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains from raw human breast milk. *Clin. Nutr. Exp.* <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2017.05.001>.

Lim, S.-K., Nam, H.-M., Jang, G.-C., Lee, H.-S., Jung, S.-C., Kim, T.-S., (2013). Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 731–736. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>.

Locatelli, C., Cremonesi, P., Caprioli, A., Carfora, V., Ianzano, A., Barberio, A., Morandi, S., Casula, A., Castiglioni, B., Bronzo, V., Moroni, P., (2017). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *J. Dairy Sci.* 100, 608–619. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11797>.

Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R.A., Peters, G., (2010). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. *PLoS Pathog.* 6, e1000715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000715>.

López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J., Velázquez-Ordóñez, V., (2015). Detección de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Arch. Med. Vet.* 47, 245–249. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2015000200018>.

Luini, M., Cremonesi, P., Magro, G., Bianchini, V., Minozzi, G., Castiglioni, B., Piccinini, R., (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Vet. Microbiol.* 178, 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.010>.

Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., Hiramatsu, K., (2002). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1147-1152.2002>.

Macori, G., Giacinti, G., Bellio, A., Gallina, S., Bianchi, D., Sagrati, D., Marri, N., Giangolini, G., Amatista, S., Decastelli, L., (2017). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Ovine Dairy Chain and in Farm-Related Humans. *Toxins (Basel)*. 9, 161. <https://doi.org/10.3390/toxins9050161>.

Mausam, M., Ray, P.K., Dey, A., Mohanty, S., Kaushik, P., Anjay, A., Sinha, M., Gupta, S.K., (2016). Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity Profiling of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Bovine Milk in Bihar. *J. Pure Appl. Microbiol.* 10, 3183–3188. <https://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.95>.

MCKAY, A.M., (2008). Antimicrobial Resistance and Heat Sensitivity of Oxacillin-Resistant, *mecA* -Positive *Staphylococcus* spp. from Unpasteurized Milk. *J. Food Prot.* 71, 186–190. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.186>.

Mirzaei, H., Javadi, A., Farajli, M., Shah-Mohammadi, A.R., Monadi, A.R., Barzegar, A., (2011<sup>a</sup>). Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: A study in city of Tabriz, Iran. *J. Vet. Res.* 67, 65-70.

Mirzaei, H., Tofighi, A., Karimi Sarabi, H., Farajli, M., (2011<sup>b</sup>). Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products in Sarab by Culture and PCR Techniques, *Journal of Animal and Veterinary Advances.* <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.3107.3111>.

Mirzaei, H., Farhoudi, H., Tavassoli, H., Farajli, M., Monadi, A., (2012). Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw and

pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques. *African J. Microbiol. Res.* 6, 6224–6229. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1701>.

Mohammed, J., Ziwa, M.H., Hounmanou, Y.M.G., Kisanga, A., Tuntufye, H.N., (2018). Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk in Tanzania. *Int. J. Microbiol.* (2018), 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/4287431>.

Njoga, E., I. Onunkwo, J., Okoli, C., I. Ugwuoke, W., A. Nwanta, J., Chah, K., (2018). Assessment of antimicrobial drug administration and antimicrobial residues in food animals in Enugu State, Nigeria, *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1515-9>.

Nusrat, J., Ifra, T.N., Mrityunjoy, A., (2015). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within raw milk and cheese samples. *Int. Food Res. J.* 22,2629–2633.

Oliveira, C.J.B., Tiao, N., de Sousa, F.G.C., de Moura, J.F.P., Santos Filho, L., Gebreyes, W.A., (2016). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. *Zoonoses Public Health* 63, 97–105. <https://doi.org/10.1111/zph.12209>.

Pamuk, S., Yildirim, Y., Seker, E., Gurler, Z., Kara, R., (2012) A survey of the occurrence and properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. *Int. J. Dairy Technol.* 65, 416–422. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00832.x>.

Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A.S., Boukouvala, E., Zdragas, A., Papa, A., Hadjichristodoulou, C., Sergelidis, D., (2018). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol.* 69, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.016>.

Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Sottili, R., Miccolupo, A., Fracalvieri, R., Santagada, G., (2016) Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiol.* 58, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.004>.

Paterson, G.K., Morgan, F.J.E., Harrison, E.M., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., (2014). Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) in bovine bulk tank milk in great britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 598–602. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt417>.

Ponnusamy, P., Murugesan, A.C., Kumar, M.R., Ramesh, A., (2015). Infectious bovine corneal ulceration associated with Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a dairy cow - A case report. *Indian Vet. J.* 92, 83–84.

Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Pontello, M.M., Morace, G., (2015). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: Prevalence, SCC mec Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. *J. Food Prot.* 78, 1142–1146. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-531>.

Ronco, T., Stegger, M., Pedersen, K., (2017). Draft Genome Sequence of a Sequence Type 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Danish Dairy Cow with Mastitis. *Genome Announc.* <https://doi.org/10.1128/genomeA.00492-17>.

Salehi, M., Razavilar, V., Mirzaei, H., Javadi, A., Banan Khojasteh, S.M., (2012). Use of restriction fragment length polymorphism to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Biol. Med.* 4, 117–120.

Schlotter, K., Huber-Schlenstedt, R., Gangl, A., Hotzel, H., Monecke, S., Müller, E., Reißig, A., Proft, S., Ehricht, R., (2014). Multiple cases of methicillin-resistant CC130 *Staphylococcus aureus* harboring mecC in milk and swab samples from a Bavarian dairy herd. *J. Dairy Sci.* 97, 2782–2788. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7378>.

Song, J. W., Yang, S.J., Shin, S., Seo, K. S., Park, Y.H., Park, K.T., (2016). Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. *J Food Prot.* 79, 1725-1732.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-067>.

Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J.A., Tenhagen, B.A., (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey. Türkyilmaz, S., Tekbiyik, S., Oryasin, E., Bozdogan, B., 2010. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health* 57, 197–203. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01257.x>.

Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J., W Friedrich, A., Kearns, A., Westh, H., M Mackenzie, F., (2012). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods, *International journal of antimicrobial agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>.

Türkyilmaz, S., Tekbiyik, S., Oryasin, E., Bozdogan, B., (2010). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health* 57, 197–203.

<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01257.x>.

Unnerstad, H.E., Bengtsson, B., Horn af Rantzien, M., Börjesson, S., (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 55, 6. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-6>.

Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S. a, Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.

Van Duijkeren, E., Hengeveld, P.D., Albers, M., Pluister, G., Jacobs, P., Heres, L., van de Giessen, A.W., (2014). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*



carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 171, 364–367.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.024>.

Visciano, P., Pomilio, F., Tofalo, R., Sacchini, L., Saletti, M.A., Tieri, E., Schirone, M., Suzzi, G., (2014). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms. *Food Control* 46, 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.022>.

Vyletelova, M., Vlkova, H., Manga, I., (2011). Occurrence and Characteristics of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin Resistant Coagulase-negative Staphylococci in Raw Milk Manufacturing. *Czech J. Food Sci.* 29, S11--S16.

Yang, F., Wang, Q., Wang, X., Wang, L., Xiao, M., Li, X., Luo, J., Zhang, S., Li, H., (2015). Prevalence of *blaZ* gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.3906/vet-1504-81>.

Zhang, T., Huang, A., Li, J., Liu, X., Li, L., Yao, L., Huang, Y., Wang, W., (2014). Characterization of Antimicrobial Resistance and Enterotoxin Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitis Milk and Food Poisoning Cases. *J. Anim. Vet. Adv.* 13, 423–429.

Zutic, M., Cirkovic, I., Pavlovic, L., Zutic, J., Asanin, J., Radanovic, O., Pavlovic, N., (2012). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. *African J. Microbiol. Res.* 6, 5887–5889.  
<https://doi.org/10.5897/AJMR12.692>.

# Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in 'coalho' cheese produced in Brazil

## Research Article

Cite this article: de Aguiar FRM, Rocha LQ, Barboza MMO, Sampaio TL, Nogueira NAP and de Menezes RRPPB. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in 'coalho' cheese produced in Brazil. *Journal of Dairy Research* <https://doi.org/10.1017/S0022029922000073>

Received: 26 March 2021  
Revised: 8 November 2021  
Accepted: 15 November 2021

Keywords:  
Dairy products; Enterotoxins; MRSA;  
*Staphylococcus aureus*

Author for correspondence:  
Ramon RPPB de Menezes,  
Email: [ramonpessoa@ufc.br](mailto:ramonpessoa@ufc.br)

Felipe R. M. de Aguiar<sup>1</sup>, Larissa Q. Rocha<sup>1</sup>, Morgana M. O. Barboza<sup>2</sup>,  
Tiago L. Sampaio<sup>3</sup>, Nádia A. P. Nogueira<sup>3</sup> and Ramon R. P. P. B. de Menezes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil and <sup>3</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

### Abstract

The experiments reported in this research communication analysed the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in 112 samples of 'coalho' cheese, from 56 dairy producing farms in 28 cities in all mesoregions of the State of Ceará, Brazil. To assess anti-microbial resistance we also examined the presence of genes encoding enterotoxins and toxic shock syndrome toxin, as well as the presence of the *blaZ* gene for  $\beta$ -lactamases, and resistance to oxacillin. The research found 69 isolates of *S. aureus*, of which 13.04% had the *mecA* gene encoding the penicillin-binding protein, which confers resistance to methicillin, in cheese samples from 6 different cities. This included the state capital, Fortaleza, which had the largest prevalence (23.19%) of *mecA* positive isolates. It was also found that 55.07% of the isolates of *S. aureus* had the *blaZ* gene, and 7.25% demonstrated resistance to oxacillin in the plate disc diffusion tests. We did not show the presence of isolates carrying toxigenic genes. The findings suggest that strict supervision of production processes in the dairy industry is necessary in all production scale processes, thus preventing contamination and possible problems for consumers.

*Staphylococcus aureus* is one of the main human pathogens, being found in close relationship with warm-blooded animals and, consequently, in the food that comes from these animals (Costa *et al.*, 2018). Although *S. aureus* has been a known pathogen for a long time, isolates of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) have been found since the 1980s, being responsible for hospital-acquired infections and showing the capacity to resist various antimicrobials. Currently, it has become a worldwide pathogen related to the community and food transmission (Gonzalez *et al.*, 2017). The antimicrobial resistance capacity of *S. aureus* is the result of several factors, which include the production of  $\beta$ -lactamases (encoded by the *blaZ* gene) and alteration of the binding site for  $\beta$ -lactam antibiotics due to the production of an additional penicillin-binding protein present in methicillin-resistant strains of *S. aureus* (Song *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). Some studies demonstrate that methicillin-resistant strains of *S. aureus* are already a reality in the agricultural environment, especially on farms that produce dairy products, such as cheese, including the rennet type. This resistance characteristic may be the result of the presence of a gene called *mecA* in these microorganisms (Aragão *et al.*, 2019).

'Coalho' cheese is a dairy food typically consumed in the Northeast region of Brazil, obtained through the coagulation of milk using rennet or other coagulating enzymes, with or without the presence of the appropriate lactic bacteria, and it is a product of medium to high humidity, with fat content ranging from 35 to 60% of its solid mass. Its production generally occurs in small and medium rural properties belonging to dairy producers, with low use of technologies and herds that comprise few animals (Brazil, 2003; Soares *et al.*, 2017).

### Material and methods

#### Sampling

Samples of artisanal rennet cheese produced with raw milk were collected in small and medium-sized properties that produce cheese and dairy products in 28 municipalities of the state of Ceará, which were equally divided into the seven mesoregions of the State (Metropolitan Region of Fortaleza, North, Northwest, South, South-Central, 'Sertões' and 'Jaguaribe' regions) and randomly chosen, comprising 4 municipalities per mesoregion, as shown in Fig. 1. The collections took place between the months of March and December 2018, and two dairy producers were chosen in each municipality participating in the research, from which two samples were collected per dairy, totalling 56 dairy products and 112 samples.

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press on behalf of Hannah Dairy Research Foundation.



CAMBRIDGE  
UNIVERSITY PRESS

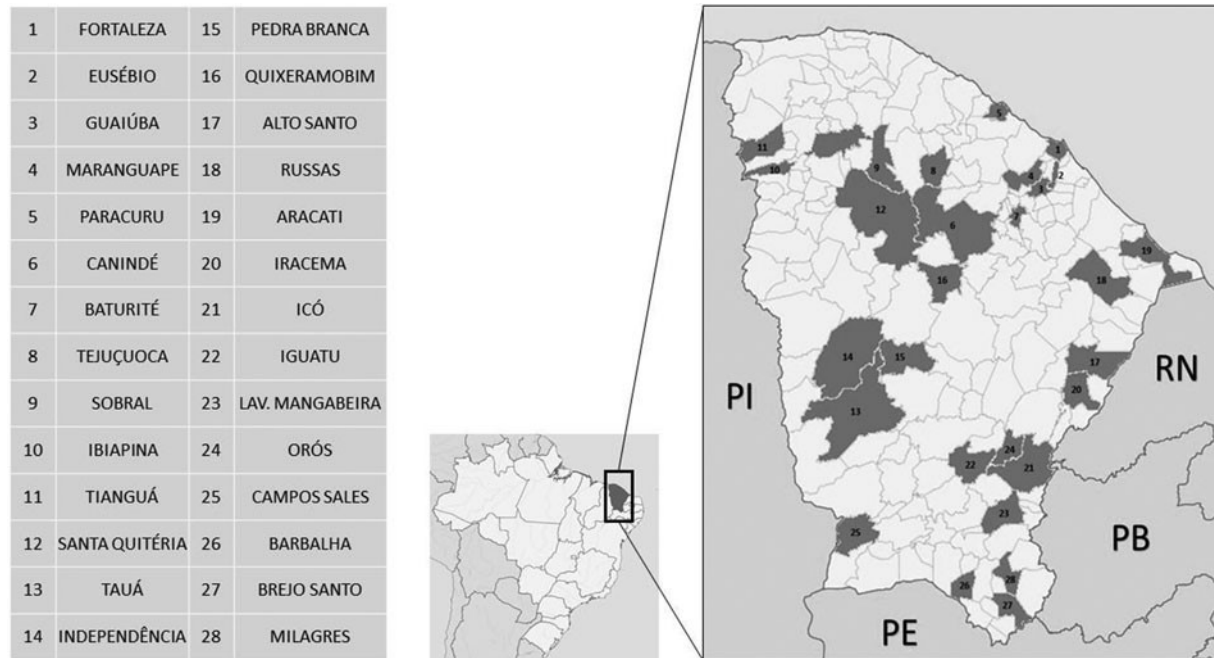


Fig. 1. Map of Brazil, showing the location of the State of Ceará, with the distribution of the cities where the artisanal 'coalho' cheese samples were collected. PE, Pernambuco; PI, Piauí; PB, Paraíba; RN, Rio Grande do Norte. Adapted from Brazil Ceará location map, available at: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Brazil\\_Ceara\\_location\\_map.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Brazil_Ceara_location_map.svg). Accessed on 27 July 2020.

The samples acquired weighed about 500 g and were immediately packaged in sealed sterile plastic bags, identified, stored under refrigeration in isothermal boxes containing ice, and sent to the Applied Microbiology Research Laboratory of the Federal University of Ceará for microbiological and molecular analyses.

### Isolation of *S. aureus*

For the isolation and identification of *S. aureus*, the methodology recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil was used. The calculation for counting the colony-forming units (CFUs) was performed through the observation of the number of typical and atypical colonies of the microorganism. The dilution inoculated into the culture medium used was produced using  $25 \pm 0.2$  g of the sample in 225 ml of 0.1% peptone salt solution, obtaining a  $10^{-1}$  dilution and, from this one, serial dilutions up to  $1 \times 10^{-5}$  were performed. The percentage of confirmed colonies and other information regarding the methodology are detailed in the online Supplementary File. In total, 306 typical colonies and 154 atypical colonies were selected, and the typical colonies were submitted to Gram stain for morphotintorial characterization.

### *S. aureus* identification

All typical *S. aureus* colonies were submitted to DNA extraction and a specific region of *nuc* gene was amplified to confirm the

*S. aureus* species, according to Kateete *et al.* (2010). Genomic DNA extraction was performed using a QIAamp DNA mini-Kit (Qiagen, Hilden, Germany), strictly following the manufacturer's guidelines, adding the Tris-EDTA and Triton X lysis buffer, 10 mg/ml lysostaphin, and 20 mg lysozyme/ml. The extracted DNA was stored in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further tests.

The *S. aureus* standard strain ATCC 43300 was used as a positive control for detection of the *nuc* gene and microbial DNA-free water (Qiagen, Hilden, Germany) as a negative control. The *mecA* gene for the expression of penicillin-binding proteins, *blaZ* for  $\beta$ -lactamases, *sea*, *seb*, and *sec* for enterotoxins and *tst1* for toxic shock syndrome toxins were also screened and the *S. aureus* strains ATCC 43300, ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095

and ATCC 13566 were used as positive controls, respectively, with microbial DNA-free water (Qiagen, Hilden, Germany) as a negative control for all genes. Details of the reaction are shown in the online Supplementary File and the primers used are described in online Supplementary File S1.

### Oxacillin susceptibility test

For the characterization of the oxacillin susceptibility profile of the *S. aureus* isolates from 'coalho' cheese samples, each typical colony chosen was seeded on Mueller-Hinton agar (LABCLIN, Brazil) with the help of a sterile swab, after adjusting the inoculum compatible with the 0.5 density of the McFarland scale. The oxacillin discs (1  $\mu\text{g}$ ) were aseptically applied on Mueller-Hinton agar (LABCLIN, Brazil) and the plates were subsequently incubated in a bacteriological oven at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. After that, the inhibition zone (mm) was measured in comparison with the susceptibility zones, provided by the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016).

### Results

After the analysis of the samples of 'coalho' cheese produced with cow's milk from the 28 chosen municipalities of Ceará, microorganism growth was observed in Baird-Parker agar in 100% of the collected samples. The presence of the *nuc* gene

Table 1. Number and percentage of positive *S. aureus* isolates for the presence of *nuc*, *mecA*, *blaZ* and oxacillin-resistant genes

	<i>nuc</i> +		<i>mecA</i> +		<i>BlaZ</i> +		Oxacillin resistance	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
RMF	16	23.19	4	5.80	10	14.49	3	4.35
North	9	13.04	0	0.00	6	8.70	0	0.00
Northwest	11	15.94	1	1.45	5	7.25	1	1.45
Sertões	14	20.29	1	1.45	6	8.70	1	1.45
Jaguaribe	7	10.14	0	0.00	5	7.25	0	0.00
Central-South	8	11.59	0	0.00	2	2.90	0	0.00
South	4	5.80	1	1.45	4	5.80	0	0.00
Total	69		7		38		5	

RMF, Metropolitan Region of Fortaleza.

was evaluated in 306 typical colonies obtained from the 112 analysed samples and, of this total, 69 colonies (22.55%) were positive (Table 1).

Of the 69 isolates of *S. aureus* in 'coalho' cheese samples, most were found in those produced in the metropolitan region of Fortaleza (RMF) (16/23.19%), followed by 'Sertões' (14/20.29%), Northwest (11/15.94%), North (9/13.04%), South-Central (8/11.59%), Jaguaribe (7/10.14%), and South regions (4/5.80%), as shown in online Supplementary Figure S1. Of the isolates, 7 (7.25%) demonstrated the presence of the *mecA* gene, determining the presence of methicillin-resistant isolates in food products, of which 4 isolates in the RMF area (5.80%), 1 (1.45%) in the Northwest, 'Sertões', and South regions each.

Of the 69 isolates tested for the presence of the *blaZ* gene, 38 (55.07%) were positive, demonstrating that more than half had the coding gene for the production of  $\beta$ -lactamase. It is noteworthy that all 7 isolates carrying the *mecA* gene also had the *blaZ* gene, corresponding to 18.42% of these isolates; while

31 (81.58%) carried only the *blaZ* gene and not the *mecA* gene, indicating the possibility of multiple resistance mechanisms acting in synergy in these microorganisms. Additionally, the highest frequency of positive *blaZ* isolates was found in the RMF area, with 10 (14.49%) isolates, followed by the North and 'Sertões' regions, both with 6 (8.70%) isolates; Northwest and Jaguaribe Regions had 5 (7.25%) isolates with this genotype; 4 (5.80%) isolates were found in the South; and the South-Central region had 2 (2.90%) positive *blaZ* isolates.

Resistance to oxacillin demonstrated through the disk-diffusion technique was found in 5 (7.25%) isolates of *S. aureus*, and all of them had a genotype that showed the presence of the *mecA* and *blaZ* genes; 3 isolates (4.35%) were found in the RMF area, and 1 (1.45%) in the Northwest and 'Sertões' regions.

We did not observe the presence of genes related to staphylococcal enterotoxins (*sea*, *seb*, and *sec*) in any isolate. In addition to the genes related to enterotoxins, we also evaluated the presence of the *tst1* gene, indicating the toxic shock syndrome toxin (TSST), which causes the syndrome of the same name. None of the evaluated isolates showed the presence of this gene, which indicates the possible safety of the cheese produced in the State of Ceará regarding this disease, which can be fatal.

## Discussion

The presence of staphylococcal isolates in foods is an important finding when listing their health-related aspects, including milk and dairy products, especially when these isolates show the presence of the *mecA* gene. This gene is one of those responsible for conferring the methicillin-resistance characteristic, since it encodes a penicillin-binding protein with low affinity for semi-synthetic penicillins, such as methicillin (Riva *et al.*, 2015). Several studies demonstrate that the presence of MRSA in dairy farms is directly related to the transfer of these isolates between humans and animals, whether bovine, caprine or porcine, and they can generate infectious processes in dairy animals, such as staphylococcal mastitis, affecting the microbiological quality of the final product produced with this raw material (Costa *et al.*, 2018).

In a Brazilian study by Silva *et al.* (2015) with food handlers, the presence of staphylococcal isolates was verified in the hands and/or nose of all of them, and 75% of the isolates of *S. aureus* exhibited the presence of genes related to the production of enterotoxins. This presence has already been noted in other countries around the world, such as South Korea (Song *et al.*, 2016), demonstrating that this presence is becoming a global health problem. Fortunately, in the present study, none of the analysed isolates showed the presence of genes related to the production of enterotoxins.

The presence of a diversified microbiota has multifactorial justifications, such as the fact that extensive and intensive livestock farming in large producing properties, whether of milk or beef, stopped being dedicated to monocultures and started sharing space with other types of livestock, such as swine, goats and sheep, favouring the transfer of microorganisms between cultures. However, the presence of pathogenic microorganisms in dairy products occurs mainly from the secretion of these microorganisms by infected animals (Costa *et al.*, 2018; Papadopoulos *et al.*, 2018).

Studies demonstrate that the genetic element staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) and in particular the type of this cassette is important for the microbial resistance demonstrated by MRSA isolates, including oxacillin. In some studies it was shown that SCC*mec* types I, IV, V, VI and VII usually only favoured the resistance of the isolates to  $\beta$ -lactam antibiotics, while types II and III were characteristic of multidrug-resistant isolates, due to plasmids and transposons containing genes of resistance that integrated with SCC*mec*.

(McKay, 2008). In contrast, others showed that the type of cassette did not crucially influence the characterization of the resistance profile, demonstrating that this factor is multifactorial, and it is not feasible to take this characteristic into account (Songet *et al.*, 2016).

Resistance to *mecA* has been correlated with the presence of the *mecA* gene for a long time. On the other hand, where resistance to oxacillin is concerned, the presence of *S. aureus* isolates positive for *mecA* but phenotypically susceptible to oxacillin (OS-MRSA) has been reported, including in Brazil (Guimarães *et al.*, 2017; Danelli *et al.*, 2020). These latter authors found strains of OS-MRSA in the nasal cavity of about 2000 health professionals and students from a university hospital in southern Brazil, raising an alert about the fact that these strains can be mistakenly identified as *S. aureus* sensitive to methicillin (MSSA) by phenotypic methods routinely used in most clinical laboratories, which would pose a threat to the treatment of staphylococcal infections. However, the concern related to the presence of OS-MRSA is not restricted, to the healthcare environment only. Corroborating what was found in the present study, where 2 *mecA* positive isolates were phenotypically sensitive to oxacillin, Guimarães *et al.* (2017) identified the presence of OS-MRSA isolates in milk samples collected from the mammary glands of cows diagnosed with subclinical mastitis in a dairy farm located in the state of São Paulo, Brazil, demonstrating that the dairy production chain is also susceptible to this problem.

Some MRSA isolates, found in many studies that associate them to animal contamination, are known to be important causes of hospital acquired infections, often due to their ability to produce biofilms in medical and hospital devices such as catheters. This production is directly associated with the dysfunction of the *agr* (accessory gene regulator), present in the gene locus of the same name, and important for the regulation of the formation, development, and quorum sensing in these biofilms and other virulence factors. Therefore, it is suggested that molecular therapeutic strategies to inactivate this gene would not have the desired efficacy, since the dysfunction of this gene stimulates the production of biofilm and can be an important medical problem (Archer *et al.*, 2011).

In conclusion, the results of the present study demonstrate a significant presence of *S. aureus* in 'coalho' cheese samples from different regions of Ceará, mainly in the metropolitan region of Fortaleza. It should be noted that, from the perspective of the relevance of microbial resistance, resistance to oxacillin was found, concomitantly with resistance to methicillin and  $\beta$ -lactamase production. With this information in mind, the relevance of further studies related to clinical and subclinical bovine mastitis, on the quality control of dairy products, on the health legislation in force in the country, and on the analysis of products for export is ratified.

**Supplementary material.** The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0022029922000073>.

**Acknowledgements.** We would like to thank Centro Universitário Fametro and Universidade Federal do Ceará for the laboratory structure availability to carry out this research; as well as the dairy farms and producers of 'coalho' cheese in the State of Ceará, for providing the samples used in this study. We also thank the National Council for Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) in Brazil, for funding this research.

## References

- Aragão BB, Trajano SC, Silva JG, Oliveira RP, Pinheiro Júnior JW, Peixoto RM and Mota RA (2019) Short communication: high frequency of  $\beta$ -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science* 102, 6923–6927.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME and Shirliff ME (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2, 445–459.
- Brazil (2003) Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction no 62, of 26 August 2003. Official Gazette [of] the Federative Republic of Brazil 1 Section I 16–17.
- Chen C, Zhao Q, Guo J, Li Y and Chen Q (2017) Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *Nuc*, and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Current Microbiology* 74, 965–971.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2016) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3.
- Costa FN, Belo NO, Costa EA, Andrade GI, Pereira LS, Carvalho IA and Santos RL (2018) Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health Production* 50, 1089–1097.
- Danelli T, Duarte FC, Oliveira TA, Silva RS, Alfieri DF, Gonçalves GB, Oliveira CF, Tavares ER, Yamauchi LM, Perugini MRE and Yamada-Ogatta SF (2020) Nasal carriage by *Staphylococcus aureus* among health-care workers and students attending a university hospital in southern Brazil: prevalence, phenotypic, and molecular characteristics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2020, 3808036.
- Gonzalez AGM, Marques LMP, Gomes MDSA, Beltrão JCDC, Pinheiro MG, Esper LMR, Paula GR, Teixeira LA and Aguiar-Alves F (2017) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiology Letters* 364, 1–7.
- Guimarães FF, Manzi MP, Joaquim SF, Richini-Pereira VB and Langoni H (2017) Short communication: outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *Journal of Dairy Science* 100, 723–730.
- Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML and Najjuka FC (2010) Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13, 9–23.
- McKay AM (2008) Antimicrobial resistance and heat sensitivity of oxacillin-resistant, *mecA*-positive *Staphylococcus* spp. From unpasteurized milk. *Journal of Food Protection* 71, 186–190.
- Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Boukouvala E, Zdragas A, Papa A, Hadjichristodoulou C and Sergelidis D (2018) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiology* 69, 43–50.
- Riva A, Borghi E, Cirasola D, Colmegna S, Borgo F, Amato E, Pontello MM and Morace G (2015) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *Journal of Food Protection* 78, 1142–1146.
- Silva SS, Cidral TA, Soares MJ and de Melo MC (2015) Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. From food handlers in a university restaurant. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 921–925.
- Soares EKB, Esmerino EA, Ferreira MVS, Silva MAAP, Freitas MQ and Cruz AG (2017) What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering coalho cheese in the Brazilian northeast and south-east area using word association. *Food Research International* 102, 553–558.
- Song JW, Yang SJ, Shin S, Seo KS, Park YH and Park KT (2016) Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. *Journal of Food Protection* 79, 1725–1732.