



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Isadora Caroline Marian

**Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo  
colonial artesanal**

Florianópolis  
2023

Isadora Caroline Marian

**Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo  
colonial artesanal**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvani Verruck

Florianópolis

2023

Marian, Isadora Caroline  
Resistência antimicrobiana em cepas de Escherichia coli  
isoladas de queijo colonial artesanal / Isadora Caroline  
Marian, Silvani Verruck, 2023.  
69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade  
Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em  
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Resistência antimicrobiana. 3.  
E. coli. 4. Análises microbiológicas. I. Verruck, Silvani. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia  
de Alimentos. III. Título.

Isadora Caroline Marian

**Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo colonial artesanal**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 03 de julho de 2023.



Coordenação do Curso

**Banca examinadora**



Profa. Silvani Verruck, Dra.

Orientadora



Profa. Marília Miotto, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho a todos que  
caminharam comigo ao longo  
dos anos nesta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria, por meio deste, de expressar meus sinceros agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta etapa tão importante. Todo o apoio e suporte foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

A minha família, que foi meu pilar durante o passar destes anos. Sem o apoio, amor e incentivo dos meus pais, Alair e Maristela, essa jornada não teria sentido. Obrigada por celebrarem comigo cada conquista, por acreditarem em mim e me motivarem nos momentos difíceis.

Agradeço profundamente à Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura educacional e ambiente de aprendizado que a instituição me proporcionou ao longo dos anos. Aos meus professores, o conhecimento adquirido e as experiências vividas aqui serão sempre inestimáveis em minha vida. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro nas análises deste trabalho, sob termos de outorga nº 2021TR001446 e nº 2022TR002005.

À minha orientadora, Silvani Verruck, por todo o suporte, amparo e por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência ao longo deste trabalho. Agradeço pelo seu tempo, paciência e incentivos que tornaram essa jornada muito mais valiosa e cheia de aprendizados. Obrigada por me tirar da minha zona de conforto intelectual, para que eu pudesse me aventurar no mundo da microbiologia, mesmo que por um período curto de tempo. As minhas colegas de laboratório, Luísa, Vanessa, Manu e Mari, obrigada por todo o suporte e cafés fora de hora.

Aos meus colegas e amigos, que ao longo dos anos compartilharam das mesmas incertezas e aflições. Obrigada pelos dias de estudos, pelos inúmeros seminários e listas de exercícios. Em especial, Victor, que me mostrou o mundo por outras lentes, o conhecimento como chave para a liberdade.

A todos, que de alguma forma fizeram parte deste processo, meu muito obrigada!

*“Faça bom uso da frustração...”*

## RESUMO

O queijo colonial artesanal é um produto típico da região sul do Brasil, considerado o principal produto familiar produzido na região. Possui características organolépticas de cor, odor e sabor característicos influenciados diretamente pela microbiota endógena da região produtora. A população microbiana presente no queijo colonial artesanal depende da qualidade da matéria-prima, processo higiênico-sanitário, clima e raça do gado leiteiro. O principal objetivo deste trabalho foi a investigação da resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo colonial artesanal produzido a partir de leite cru na cidade de Seara, Santa Catarina. Foram analisadas cinco amostras com diferentes tempos de maturação, produzidos nos anos de 2022 e 2023. O teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) foi realizado utilizando o método de disco-difusão de Kirby-Bauer, foram testados 16 antimicrobianos de 7 classes distintas. Os isolados foram submetidos a um contato prévio com dois antimicrobianos a fim de realizar uma triagem inicial, cerca de 75% dos isolados resistiram e seguiram para o TSA. Ao todo, foram avaliados 53 isolados, cerca de 17,0% foram totalmente susceptíveis aos antimicrobianos testados. Todos os isolados foram totalmente susceptíveis a amoxicilina-ácido clavulânico, ertapenem, sulfametoxazol-trimetoprim, meropenem e imipenem, além disso os isolados de 2022 também foram suscetíveis a amicacina e gentamicina enquanto os de 2023 foram susceptíveis a ampicilina. A maior resistência foi apresentada a norfloxacina (20,0% nos isolados de 2022 e 36,4% nos isolados de 2023), seguido pela tetraciclina (15,0% e 27,3%) e cefoxitina (15,0% e 18,0%), respectivamente. Além disso, investigou-se a presença de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) utilizando o teste de difusão em disco duplo, contudo nenhum isolado deste tipo foi confirmado. Cerca de 15,0% dos isolados obtidos a partir das amostras de 2022 e 12,1% de 2023, apresentaram um perfil de multirresistência, ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Além de avaliar a resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli*, este trabalho visou quantificar os principais microrganismos presentes nas amostras conforme requerido pela legislação brasileira. Os resultados obtidos a partir das análises microbiológicas para mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, bactérias ácido lácticas, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, estafilococos coagulase positiva estão de acordo com o limite máximo tolerável definidos pela Portaria MAPA 146/96 e IN 161/22. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenese* estavam ausentes em todas as amostras analisadas. Nenhuma das amostras apresentaram níveis detectáveis de toxina estafilocócica. Nos últimos anos, houve um aumento significativo no número de surtos de origem alimentar causados por *E. coli*, superando em números os surtos causados por *Salmonella* e *Staphylococcus*. Este estudo encontra sua justificativa na busca por estimular uma reflexão sobre a resistência antimicrobiana, ao mesmo tempo em que aborda questões cruciais relacionadas à saúde única.

**Palavras-chave:** antimicrobianos; disco-difusão; análises microbiológicas.



## ABSTRACT

Artisanal colonial cheese is a typical product from the southern region of Brazil, considered the main family-produced product in the region. It has organoleptic characteristics of color, odor, and flavor directly influenced by the endogenous microbiota of the producing region. The microbial population present in artisanal colonial cheese depends on the quality of the raw material, hygienic-sanitary process, climate, and breed of the dairy cattle. The main objective of this study was to investigate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from artisanal colonial cheese produced from raw milk in the city of Seara, Santa Catarina. Five samples with different maturation times, produced in the years 2022 and 2023, were analyzed. The antimicrobial sensitivity test (AST) was performed using the Kirby-Bauer disk diffusion method, testing 16 antimicrobials from 7 different classes. The isolates were subjected to prior contact with two antimicrobials to perform an initial screening, and about 75% of the isolates resisted and proceeded to AST. In total, 53 isolates were evaluated, and approximately 17.0% were fully susceptible to the tested antimicrobials. All isolates were fully susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, ertapenem, sulfamethoxazole-trimethoprim, meropenem, and imipenem. In addition, isolates from 2022 were also susceptible to amikacin and gentamicin, while those from 2023 were susceptible to ampicillin. The highest resistance was observed against norfloxacin (20.0% in isolates from 2022 and 36.4% in isolates from 2023), followed by tetracycline (15.0% and 27.3%) and cefoxitin (15.0% and 18.0%), respectively. Additionally, the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* was investigated using the double-disk diffusion test, but no isolates of this type were confirmed. Approximately 15.0% of the isolates obtained from the 2022 samples and 12.1% from 2023 exhibited a multidrug-resistant profile, meaning they were resistant to three or more classes of antimicrobials. In addition to evaluating the antimicrobial resistance of *E. coli* strains, this study aimed to quantify the main microorganisms present in the samples as required. The results obtained from microbiological analyses for aerobic mesophiles, molds and yeasts, lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, *E. coli*, and coagulase-positive staphylococci are in accordance with the maximum tolerable limits defined by Portaria MAPA 146/96 and IN 161/22. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were absent in all analyzed samples. None of the samples showed detectable levels of staphylococcal toxin. In recent years, there has been a significant increase in the number of foodborne outbreaks caused by *E. coli*, surpassing the outbreaks caused by *Salmonella* and *Staphylococcus* in terms of numbers. This study is justified by the aim to foster a reflection on antimicrobial resistance, while simultaneously addressing critical issues related to the concept of One Health.

**Keywords:** antimicrobials; disk diffusion; microbiological analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos queijos típicos brasileiros.....	21
Figura 2. Fluxo geral de produção do queijo colonial artesanal.....	22
Figura 3. Mecanismos horizontais de transferência de genes de resistência. .....	38
Figura 4. Esquema da metodologia utilizada para a realização da seleção de potenciais cepas resistentes. ....	49
Figura 5. Gráfico do perfil de resistência de isolados de <i>E. coli</i> . ....	55
Figura 6. Evolução do perfil de resistência das amostras entre os anos de 2022 e 2023 .....	56
Figura 7. Evolução do perfil de resistência intermediária das amostras entre os anos de 2022 e 2023.....	58

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cepas patogênicas de <i>Escherichia coli</i> .....	32
Quadro 2. Estudos que investigaram genes de resistência de <i>E. coli</i> isolada em leite e produtos lácteos.....	35
Quadro 3. Estudos que investigaram genes de resistência de <i>E. coli</i> isolada em leite e produtos lácteos (continuação) .....	36
Quadro 4. Estudos que investigaram genes de resistência de <i>E. coli</i> isolada em leite e produtos lácteos (continuação) .....	37
Quadro 5. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos.....	41
Quadro 6. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos (continuação) .....	42
Quadro 7. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos (continuação) .....	43
Quadro 8. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos (continuação) .....	44
Quadro 9. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos (continuação) .....	45
Quadro 10. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas em leite e produtos lácteos (conclusão) .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das amostras de queijo colonial artesanal coletadas .....	47
Tabela 2. Antibióticos utilizados no teste de sensibilidade antimicrobiana ...	50
Tabela 3. Resultado das análises microbiológicas para queijo Colonial artesanal.....	51
Tabela 4. Perfil de resistência das cepas isoladas a partir de amostras de queijo colonial artesanal.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
Bals	Bactérias Ácido Láticas
BHI	Brain Heart Infusion
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Brcast	Comite Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CAZ	Ceftadizima
CBT	Contagem Bacteriana Total
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacino
CPM	Cefepime
CSLI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Cefotaxima
Dtas	Doenças Transmitidas por Alimentos
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
ECOFF	Valor de Corte Epidemiológico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> Entero-Hemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
GEN	Gentamicina
IN	Instrução Normativa
IPM	Imipenem
MAPA	Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento
MPM	Meropenem
NAL	Ácido Nalidíxico
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCA Plate Count Agar  
PCR Reação em Cadeia da Polimerase  
POP Procedimento Operacional Padrão  
RAM Resistencia Antimicrobiana  
RBQL Rede Brasileira da Qualidade do Leite  
RG1 Amostra de 2023 Com 1 Dia de Maturação  
RG7 Amostra de 2023 Com 7 Dias de Maturação  
RGD21 Amostra de 2022 Com 21 Dias de Maturação  
RGD7 Amostra de 2022 Com 7 Dias de Maturação  
RIISPOA Regulamentos de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de

#### Origem Animal

RP15 Amostra de 2023 com 15 Dias de Maturação  
RTIQ Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade  
SHU Síndrome Hemolítico-Urêmica  
SUT Sulfametoxazol-Trimetoprima  
TBX Tryptone Bile X-Glucuronide  
TET Tetraciclina  
TSA Teste de Susceptibilidade à Antimicrobianos  
UFC Unidade Formadoras de Colonias  
WHO World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1	QUEIJO ARTESANAL .....	19
<b>3.1.1</b>	<b>Aspectos legais da produção do queijo artesanal</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Microbiologia do queijo colonial artesanal</b> .....	<b>26</b>
3.2	ESCHERICHIA COLI .....	29
<b>3.2.1</b>	<b>Patótipos</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Resistência microbiana</b> .....	<b>33</b>
3.3	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE E. COLI ISOLADOS DE LEITE CRU E PRODUTOS LÁCTEOS .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
4.1	AMOSTRAS.....	47
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	47
<b>4.2.1</b>	<b>Isolamento de <i>E. coli</i></b> .....	<b>48</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Seleção de cepas resistentes</b> .....	<b>48</b>
4.3	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS (TSA) POR MEIO DO MÉTODO QUALITATIVO DE KIRBY-BAUER .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
5.1	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	51
5.2	FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE <i>E. coli</i> .....	53
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, ainda não existe uma definição única prevista em legislação que determine a caracterização de um alimento artesanal. Contudo, na literatura existem diversas definições para queijos artesanais que abrangem aspectos diversos relacionados à utilização de leite cru ou pasteurizado de diferentes animais, uso de métodos manuais e de padronização. Além disso, fazem menção ao uso de formulações tradicionais, em pequena ou média escala de produção, com diferentes tipos de maturação e as diversas variedades existentes perante a comercialização (ROLDAN; REVILLION, 2019).

A legislação estadual define o queijo colonial artesanal como aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação territorial, obtido por coagulação do leite cru, fresco ou não, integral ou parcialmente desnatado, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes, completada ou não pela adição de fermento lácteo específico e/ou alimento/substância alimentícia (SANTA CATARINA, 2021). A diversidade microbiana é indispensável para o desenvolvimento das características do queijo (JOHNSON, 2017). As bactérias ácido lácticas (BALs) são destaque na microbiota do queijo colonial artesanal, pois são primordiais para obter características sensoriais desejadas deste produto (BADARÓ *et al.*, 2020). No entanto, os produtos lácteos de origem do leite cru, e especialmente, os queijos, podem estar contaminados com uma grande variedade de bactérias potencialmente prejudiciais aos seres humanos, incluindo *Escherichia coli* (IMRE *et al.*, 2022).

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* serem consideradas bactérias comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente e em diversos alimentos (SHIN *et al.*, 2015; CRECENCIO, 2018). *E. coli* é utilizado como microrganismo indicador, sendo que a recuperação e contagem desse microrganismo é utilizado como um indicador confiável de contaminação fecal e pode vir a indicar possível presença de alguns microrganismos que constituem uma ameaça à saúde pública (ALTALHI; HASSAN, 2009). A sua presença no úbere do animal também pode acarretar no desenvolvimento de mastite, que por sua vez são frequentemente tratadas com antibióticos (NIKOLOUDAKI *et al.*, 2021; RUBIOLA *et al.*, 2022).



Nas últimas décadas, o uso inadequado de agentes antimicrobianos para diferentes finalidades, terapêuticas e profiláticas, tanto em seres humanos quanto em animais de produção, levou ao aparecimento de um fenômeno de resistência antimicrobiana, tanto para o caso de bactérias comensais quanto para bactérias que ameaçam a saúde pública (IMRE *et al.*, 2022). A multirresistência em *E. coli* é uma questão preocupante, cada vez mais observada na medicina humana e na medicina veterinária, por todo o globo (POIREL *et al.*, 2018).

Dentro do contexto de saúde única, cepas antes descritas em infecções hospitalares agora também são relatadas no ambiente de produção e em alimentos (ARAGÃO *et al.*, 2022). Estudos sobre a epidemiologia e diversidade microbiológica de patógenos multirresistentes na cadeia produtiva do queijo, por exemplo, são importantes para a segurança de alimentos pois contribuem para um melhor entendimento das medidas de controle e prevenção da disseminação de patógenos (ARAGAO *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2020). Além disso, a aquisição e a transferência de genes de resistência, associados à seleção exercida pelo uso intensivo destas substâncias na criação animal destinada ao consumo humano, corroboram a importância e a necessidade de se avaliar a presença de bactérias resistentes a antibióticos nos alimentos (CARDOSO; MARIN, 2014; PIRES *et al.*, 2019). Sendo assim, a resistência antimicrobiana em *E. coli* é considerada um dos maiores desafios, em humanos e animais, em escala mundial e precisa ser encarada como um grande problema de saúde pública (POIREL *et al.*, 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem por objetivo analisar a resistência a antibióticos em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo colonial artesanal produzido a partir de leite cru.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar os principais microrganismos presentes nas amostras de queijo colonial artesanal através de análises microbiológicas clássicas
- Comparar resultados de contagem microbiana com parâmetros microbiológicos definidos pela IN 161/22
- Isolar cepas de *E. coli* de queijo colonial artesanal em diferentes tempos de maturação
- Testar os isolados quanto à resistência a antimicrobianos pelo método de Kyrbi-Bauer

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 QUEIJO ARTESANAL

Os queijos artesanais brasileiros possuem uma importância histórica, socioeconômica e cultural relevante para a comunidade tradicional brasileira. Estes produtos se distinguem pela tradição secular de fabricação passada de geração em geração, conservando características únicas de sabor quando comparadas a produtos industrializados (MARGALHO *et al.*, 2020).

A categoria dos queijos artesanais tipicamente representa um produto que é valorizado a partir de atributos extrínsecos como a utilização de leite cru, as características particulares do leite em função da tipicidade das condições edafoclimáticas do local de produção. Além disso, outros fatores importantes são as práticas de produção adotadas e das espécies e raças de animais do rebanho, além do uso de métodos manuais. Práticas e formulações mais tradicionais na elaboração dos queijos, juntamente com a presença de fermentos lácteos autóctones, atribuem características sensoriais únicas ao produto. Os queijos artesanais são característicos de produção em pequena escala e, geralmente, venda direta (ROLDAN; REVILLION, 2019)

A produção tradicional de queijo de leite cru em pequenas explorações pecuárias integradas de zonas rurais e sua comercialização nos mercados agroalimentares para consumidores urbanos é uma prática amplamente difundida em vários países (IMRE *et al.*, 2022), incluindo o Brasil. A elevada importância econômica e cultural do queijo artesanal brasileiro justifica os esforços para garantir sua segurança, qualidade e procedência (PERIN *et al.*, 2017).

O queijo colonial artesanal, típico da região sul do Brasil, herdou este nome devido à cultura, tradição, modo de vida e agricultura trazida pelos imigrantes, especialmente europeus da região não ibérica, que se instalaram no sul do país (KAMIMURA *et al.*, 2019a). Este tipo de queijo é um produto tradicionalmente produzido nas propriedades rurais para consumo familiar, ainda hoje, presente no dia a dia de diversos sulistas sendo o principal produto familiar produzido na região (CARVALHO *et al.*, 2019).

A população microbiana no queijo colonial artesanal depende de fatores como o clima, a qualidade da matéria-prima e, principalmente, do processo higiênico-

sanitário em que é submetido durante seu preparo (JOHNSON, 2017). As espécies de microrganismos que estão presentes no leite e a sua relação ao processo de produção do queijo, como a interação do consórcio de bactérias láticas, a cinética de desenvolvimento, as espécies e biótipos envolvidos são determinantes na qualidade do produto final (CARVALHO *et al.*, 2019).

A presença de uma microbiota endógena específica de cada região produtora é o que confere aos queijos artesanais características organolépticas, de cor, odor e sabor característicos (MARGALHO *et al.*, 2020) e reológicas. Contudo, microrganismos indesejáveis também podem estar presentes e afetar a qualidade destes alimentos (DE FILIPPIS *et al.*, 2018; KAMIMURA *et al.*, 2019b).

A biodiversidade da microbiota dos queijos artesanais abrange leveduras, fungos e principalmente bactérias láticas originárias do leite cru (MARGALHO *et al.*, 2020). Além disso, é possível que os produtos finais contenham uma variedade de microrganismos patogênicos, incluindo *E. coli* (IMRE *et al.*, 2022).

No Brasil, são produzidos diversos queijos artesanais, com diferenças inter-regionais nos tipos de produtos e nas práticas de fabricação (Figura 1). No estado de Minas Gerais, existe a maior diversidade intra-regional, com a produção de, pelo menos, seis queijos tradicionais diferentes: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serro e Triângulo Mineiro (PINTO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2017). Os queijos Coalhada e Manteiga são tradicionalmente produzidos no Nordeste (FERREIRA *et al.*, 2017).

Na região Sul, destacam-se os queijos Serrano e Colonial (CRUZ e MENASCHE, 2014; FUNCK *et al.*, 2015). O queijo colonial, típico do sul do país, é produzido a partir de leite cru, geralmente de vacas holandesas e Jersey, ambas raças europeias que apresentam boa produtividade (KAMIMURA *et al.*, 2019a).

Figura 1. Mapa dos queijos típicos brasileiros



Fonte: adaptado de SLOWFOOD BRASIL (2018).

Sabe-se que os queijos artesanais normalmente apresentam características típicas como sabor e textura, decorrentes da origem e composição das culturas iniciadoras ou do próprio leite, matérias-primas empregadas e condições de maturação (KAMIMURA *et al.*, 2019b; MARGALHO *et al.*, 2020). O modo de produção do queijo colonial artesanal é específico de cada produtor e/ou queijaria, de acordo com a região em que está localizado o que resulta em características sensoriais, químicas e físicas distintas e específicas. Apesar disso, de forma geral, pode-se definir um fluxo de produção deste tipo de produto (Figura 2).

Figura 2. Fluxo geral de produção do queijo colonial artesanal



Fonte: adaptado de Kamimura *et al.* (2019a)

A detecção de microrganismos em todas as etapas de produção do queijo pode ser atribuída às condições higiênico-sanitárias inadequadas na cadeia produtiva (ARAGÃO *et al.*, 2022). A segurança microbiológica dos queijos artesanais elaborados com leite cru está mais associada às condições sanitárias aplicadas na obtenção do leite e nas etapas de fabricação do queijo, falhas nas boas práticas de produção que comprometem a segurança dos alimentos (TADJINE, *et al.* 2021; ARAGÃO *et al.*, 2022).

### 3.1.1 Aspectos legais da produção do queijo artesanal

A cadeia produtiva de queijos artesanais no Brasil vem apresentando relevante evolução desde a década de 2000, viabilizada pelo desenvolvimento de normas específicas relacionadas a estes produtos. Com a atualização dos Regulamentos de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, conhecido como RIISPOA, em 2017, e a regulamentação do Selo Arte em 2019, uma série de normas estaduais e municipais passaram a ser desenvolvidas e implementadas (ARAÚJO *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, o queijo artesanal brasileiro é elaborado a partir de leite cru, exceto os queijos Manteiga e Coalhada, apesar de a legislação brasileira estabelecer a obrigatoriedade da pasteurização do leite utilizado na produção de queijos com período de maturação inferior a 60 dias (CARVALHO *et al.*, 2016; BRASIL, 1996). No entanto, na última década a regulamentação brasileira foi atualizada e a comercialização destes produtos passou a ser permitida, com algumas ressalvas (KAMIMURA *et al.*, 2019b; BRASIL, 2013).

A Instrução Normativa nº 30 de 2013, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), passou a autorizar a fabricação de queijos com leite cru com período inferior a 60 dias, anteriormente estabelecido, desde que requisitos pré-estabelecidos sejam atendidos (BRASIL, 2013). Os requisitos estabelecidos pela IN 30/2013, art. 3º, e destinados às propriedades rurais onde estão localizadas as queijarias determina que as mesmas devem descrever e implementar:

- a) Programa de Controle de Mastite com a realização de exames para detecção de mastite clínica e subclínica, incluindo análise do leite da propriedade em laboratório da Rede Brasileira da Qualidade do Leite (RBQL) para composição centesimal, contagem de células Somáticas e contagem bacteriana total (CBT);
- b) Programa de Boas Práticas de Ordenha e de Fabricação, incluindo o controle dos operadores, controle de pragas e transporte adequado do produto até o entreposto; e
- c) cloração e controle de potabilidade da água utilizada nas atividades.

Em Santa Catarina, a legislação abrange a utilização de leite cru bovino para a produção de queijos artesanais, permitindo sua obtenção em propriedades próximas à queijaria, pela Lei 17.486, de 16 de janeiro de 2018 (Santa Catarina 2018; Araújo *et al.*, 2020).

Em novembro de 2021, foi aprovada a Lei Ordinária nº 18.250, que dispõe sobre os requisitos exigidos para a elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru. Nesta, define-se queijo colonial artesanal como: “aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação territorial, obtido por coagulação do leite cru, fresco ou não, integral ou parcialmente desnatado, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes, complementada ou não pela adição de fermento lácteo específico e/ou alimento/substância alimentícia”. O Art. 12º impõe que o leite que for utilizado na elaboração do queijo deve ser submetido ao processo de filtração manual ou mecanizada antes da sua utilização. Além disso, o Art. 7º cita que o processo de elaboração do queijo colonial artesanal poderá apresentar as características distintas:

- a) utilização de leite cru, sendo permitida a junção de leite de duas ordenhas sequenciais;
- b) desnate do leite opcional de uma das ordenhas quando houver junção de leite de duas ordenhas;
- c) salga no leite, na massa ou na superfície do queijo (salga a seco ou em salmoura);
- d) massa crua ou semicozida;
- e) prensagem manual ou mecanizada;
- f) maturação em temperatura ambiente ou em temperaturas de refrigeração/climatização (mínima de 5°C) em um período mínimo de 5 (cinco) dias e suficiente para garantia da inocuidade microbiológica;
- g) utilização opcional de utensílios de madeira durante o processo de fabricação e maturação; e
- h) tratamento opcional da casca com corante obtido de forma natural ou com substância alimentícia.

O produto obtido deve apresentar consistência macia, firme ou dura e textura elástica, amanteigada ou quebradiça, em formato redondo, quadrado ou retangular e



peso variável de 0,4 kg a 8 kg. Cor amarelo palha a amarelo ouro, sabor ligeiramente ácido ou amendoado e odor láctico. Podendo apresentar umidade baixa (até 35,9%), média (entre 36,0 e 45,9%) ou alta (entre 46,0 até 54,9%) bem como, ser classificado entre semigordo (25,0 até 44%), gordo (45,0 até 59,9%) ou extragordo (mais que 60%) a depender do teor de gordura presente (BRASIL, 1996; SANTA CATARINA, 2021).

Outro aspecto importante quanto a elaboração de produtos artesanais em território brasileiro é a concessão do Selo Arte. O Decreto 9.918, que dispõe sobre a fiscalização de produtos de origem animal produzidos de forma artesanal, determinou que esses produtos sejam então identificados por um selo único com a indicação “Arte” (BRASIL, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2020).

Os selos de identificação Artesanal, selo Arte e selo Queijo Artesanal, são certificados que asseguram que os produtos de origem animal foram elaborados artesanalmente, fazendo uso de receitas e/ou processos considerados artesanais, de valorização ou vinculação, regionais ou culturais. Esta certificação, assegura que o produto possui propriedades organolépticas únicas, originadas do modo de fabricação artesanal comum da região, tradição ou cultura. Além disso, certifica-se que foram adotadas as Boas Práticas Agropecuárias e as Boas Práticas de Produção, durante toda a elaboração do alimento (BRASIL, 2021).

Todas essas legislações tem sido criadas e implementadas com o objetivo de tipificar, padronizar e regulamentar os processos de produção e o comércio de queijos artesanais produzidos por produtores rurais (ARAÚJO *et al.*, 2020). Além dos requisitos específicos, estes produtos ainda precisam estar em conformidade as demais legislações brasileiras. A Instrução Normativa nº 161, de 6 de julho de 2022, por exemplo, estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. As análises microbiológicas recomendadas para queijos, em geral, são: enterotoxinas estafilocócicas (ng/g), *Salmonella*/25g, Estafilococos coagulase positiva/g, *Escherichia coli*/g e bolores e leveduras/g. Já a Portaria nº 146 de 1996 MAPA, ainda vigente, em seu Anexo II define o regulamento técnico geral para a fixação de requisitos microbiológicos de queijos em geral descrevendo microrganismos e critérios de aceitação.

Os padrões microbiológicos do queijo colonial artesanal devem atender aos critérios estabelecidos por legislação vigente, além disso estes padrões são definidos com base na umidade do produto (SANTA CATARINA, 2021). Ademais, a IN 161/2022

juntamente com a Portaria nº146/1996 estabelecem limites mínimos e máximos para cada análise descrita anteriormente.

As análises microbiológicas são fundamentais na avaliação de produtos alimentícios. Contagens altas são indicativas de falhas higiênico-sanitárias durante o processo de produção do alimento e/ou contaminação cruzada em alguma etapa, capazes de causar doenças transmitidas por alimentos (RIBAS; DAROIT, 2022). As doenças transmitidas por alimentos, também conhecidas por DTAs, são resultantes de processos incorretos durante a manipulação de alimentos, podendo se manifestar por meio de infecções ou intoxicações alimentares (BRASIL, 2008). Os sintomas variam de acordo com o microrganismo ou toxina ingerido e a quantidade de alimento contaminado que foi consumido. Para reduzir os riscos das DTAs, medidas preventivas de controle como as boas práticas de fabricação (BPF) e procedimentos operacionais padrões (POPs) devem ser implementados na cadeia produtiva, visando a melhoria das condições sanitárias do ambiente e, por consequência, do produto final (BRASIL, 2008). Apesar de nem todos os microrganismos serem patogênicos, grandes quantidades presentes em alimentos podem ocasionar deteriorações no produto, diminuição da vida de prateleira além de serem prejudiciais aos consumidores, que podem desenvolver uma infecção alimentar devido ao consumo do produto.

### **3.1.2 Microbiologia do queijo colonial artesanal**

Queijo é o produto obtido a partir da coagulação completa ou parcial do leite, creme, proteína do leite parcialmente ou totalmente desnatado, ou uma combinação de todos estes utilizando algum tipo de agente coagulante (KAMIMURA *et al.*, 2019a). Os queijos artesanais produzidos a partir de leite cru ressaltam uma preocupação quanto a entrega de um produto inócuo ao consumidor e em conformidade com a legislação brasileira (BADARÓ *et al.*, 2020).

A diversidade microbiana é indispensável para o desenvolvimento das características do queijo, que são exclusivas de cada região, dependentes de fatores como o clima, qualidade da matéria-prima e do processo higiênico-sanitário ao qual é submetido (JOHNSON, 2017). As bactérias ácido lácticas (BALs) são destaque na microbiota do queijo colonial artesanal, pois são primordiais para obter características sensoriais desejadas deste produto (BADARÓ *et al.*, 2020).

As BALs vêm sendo identificadas como principal grupo presente em queijos artesanais, organismos dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e a família *Lactobacillaceae* são habitualmente encontrados e relacionados a sabor, textura e aroma (FOX *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2018). São diferenciadas em BALs homofermentativas, que metabolizam hexoses para piruvato como intermediário chave e BALS heterofermentativas que metabolizam hexoses através da via fosfatocetolase para piruvato e acetil-fosfato como intermediários chave (ZHENG *et al.*, 2020).

As espécies da família *Lactobacillaceae* são bactérias Gram-positivas, termofílicas possuem formato de bastonete, não formadores de esporos e, em geral, homofermentativos, apesar de nos habitats intestinais as espécies estarem associadas a lactobacilos heterofermentativos (ZHENG *et al.*, 2020). Consideradas probióticas, a maioria das espécies não fermenta pentoses e produzem principalmente ácido lático como produto final da fermentação (IBRAHIM, 2012). É o maior gênero dentro do grupo de bactérias ácido lácticas, compreendendo 261 espécies extremamente diversas em níveis genotípicos, fenotípicos e ecológicos (ZHENG *et al.*, 2020). *Lactococcus* são capazes de realizar proteólise, um processo que converte aminoácidos em complexos de sabor, considerado vital na fabricação de queijos (ISSA; TAHERGORABI, 2019). São cocos Gram-positivos aeróbicos, suas subespécies são predominantes em leite cru e queijos (OLAJIDE; LAPOINTE, 2022). Este é um gênero homofermentador da família das BALs, resultando em um único subproduto na fermentação de açúcares, o ácido lático. A acidificação por meio da fermentação da lactose tem por resultado a mitigação de microrganismos patogênicos (ISSA; TAHERGORABI, 2019)

*Streptococcus* são bactérias cocoides, Gram-positivas (HOSSAIN, 2014). Geralmente, são metabolicamente ativos no início do processo de fabricação do queijo, fermentando rapidamente a lactose acidificando o meio, algumas cepas são comumente utilizadas como culturas iniciadoras. Algumas cepas possuem atividade proteolítica contribuindo para aroma e sabor final do produto, enquanto outras possuem a capacidade de fermentar galactose uma característica valiosa para a indústria queijeira pois reduz tempo de produção, limita proliferação de microrganismos patogênicos e deteriorantes indesejados além de possuírem propriedades probióticas (SHANI *et al.*, 2021).

*Leuconostoc* são cocos Gram-positivos, catalase positiva, asporogênicos e heterofermentativos que produzem compostos de sabor, diacetil e acetoína, algumas cepas podem produzir exopolissacarídeos. Comumente encontrado em leite e produtos lácteos, essa espécie usa uma combinação das vias pentose fosfato e fosfocetolase para absorção de açúcar (HASSAN; FRANK, 2011; OLAJIDE; LAPOINTE, 2022)

*Enterococcus* crescem em uma variedade de queijos produzidos a partir de leite cru, sendo considerado altamente desejável pois pode desempenhar um papel importante no amadurecimento e desenvolvimento de sabor por meio de proteólise, lipólise, quebra do citrato e hidrólise da gordura, o que resulta em sabor típico e característico de queijos coloniais artesanais (TABAN *et al.*, 2014). Além disso, os enterococos são considerados probióticos, produzem bacteriocinas (enterocinas), são ativos contra *Listeria* e outros patógenos (DE FERNANDO, 2011).

As bactérias indesejáveis são uma classe representada pelas bactérias indicadoras de qualidade sanitária e/ou patogênicas como o grupo Estafilococos coagulase positiva, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (MARTINS *et al.*, 2018; RANGEL-ORTEGA *et al.*, 2023).

*Enterobacteriales* é um grande e diversificado grupo de bactérias gram-negativas, anaeróbicas facultativas em forma de bastonete e não formadoras de esporos (ADELOU *et al.*, 2016). A família *Enterobacteriaceae* compreende os principais grupos de patógenos bacterianos transmitidos por alimentos, incluindo *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* dentre outros (JANDA e ABBOTT, 2021). Além disso, *Enterobacteriales* compreende os coliformes, um grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, em forma de bastonete, capazes de fermentar lactose, produzindo ácido e gás como produtos principais (CHAUHAN *et al.*, 2016). A detecção de coliformes em produtos como queijos tem sido tradicionalmente utilizado para indicar a qualidade sanitária da sua produção.

*Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa responsável por causar a salmonelose que pode se apresentar em três manifestações clínicas: gastroenterite, febre tifoide e estado de portador. É um patógeno de origem alimentar que invade o epitélio intestinal, possui fatores de virulência que permitem a multiplicação intracelular e capaz de se espalhar pela corrente sanguínea reduzindo atividade imunológica (RANGEL-ORTEGA *et al.*, 2023).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica encontrada na água, solo e em diversos alimentos, especialmente lácteos. É vista como tão problemática na indústria de alimentos pois pode crescer e sobreviver a temperaturas de refrigeração, tolerar altas concentrações de sais e sobreviver em pH variado, de 4 a 9, o que torna seu controle um desafio (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2022). Na indústria de laticínios, essa bactéria não está associada somente a produção de queijo artesanal, mas também a produção de queijo a partir de leite pasteurizado, devido a contaminações no ambiente de processamento (SILVA *et al.*, 2022).

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo, imóvel e coagulase positiva e produtor de enterotoxina considerado um dos principais patógenos transmitidos por alimentos (RANGEL-ORTEGA *et al.*, 2023). A presença deste microrganismo é um indicativo de segurança microbiológica comprometida além de práticas higiênico-sanitárias inadequadas na cadeia produtiva (ARAGÃO *et al.*, 2022). A enterotoxina mais comum em produtos lácteos é a enterotoxina estafilocócica A, podendo ser encontrada em queijos com alta ou baixa umidade (RANGEL-ORTEGA *et al.*, 2023).

Doenças transmitidas por alimentos e diretamente ligadas ao consumo de queijo ocorreram em diversos países. Visto isso, várias avaliações de risco microbiano relacionadas a *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e infecções alimentares causadas por *Escherichia coli* vêm sendo pauta de discussão (CARVALHO *et al.*, 2019).

### **3.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas e habitantes comensais do intestino grosso dos vertebrados, incluindo seres humanos. Sua presença é benéfica, pois auxilia na produção de certas vitaminas além de participar da digestão de alimentos que não seriam digeridos na sua ausência (TORTORA, 2017). Além disso, *E. coli* e outros coliformes são frequentemente utilizados como microrganismos indicadores higiênico-sanitários. A recuperação e contagem desses microrganismos é utilizada como um indicador confiável de contaminação fecal e indica uma possível presença de microrganismos enteropatogênicos e/ou toxigênicos que constituem uma ameaça a saúde pública (ALTALHI; HASSAN, 2009).

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* serem consideradas bactérias comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente, em alimentos e existirem em grande quantidade (SHIN *et al.*, 2015; CRECENCIO, 2018). Elementos genéticos móveis podem transformar *E. coli* em um patógeno altamente adaptado, capaz de causar uma variedade de doenças, algumas linhagens patogênicas secretoras de toxina são bem adaptadas à invasão das células epiteliais intestinais, causando gastroenterite por *E. coli* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

### 3.2.1 Patótipos

Como já citado anteriormente, algumas linhagens patogênicas secretoras de toxinas são bem adaptadas à invasão das células epiteliais intestinais, causando gastroenterite por *E. coli*. Além disso, outros locais como o trato urinário e a corrente sanguínea, também podem ser afetadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As estirpes humanas de *E. coli* que causam doenças gastrointestinais são denominadas de *E. coli* diarreiogênica e podem ser divididas em cinco categorias, de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos da patogenicidade, determinantes de virulência específicos e associação com certos tipos de sorotipos (Quadro 1), em diversos grupos que podem variar em seus períodos de incubação, duração da enfermidade e virulência (OHMURA-HOSHINO *et al.*, 2022; FORSYTHE, 2013).

Nos países em desenvolvimento, os patótipos ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e EAEC (*E. coli* enteroagregativa) são considerados como principais causas de diarreia infantil persistente, com consequência potencialmente fatais se não tratadas (OHMURA-HOSHINO *et al.*, 2022).

EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) é o principal patótipo associado a surtos de intoxicação alimentar no mundo (OHMURA-HOSHINO *et al.*, 2022; CLEMENTS *et al.*, 2012). Apesar de as infecções por EIEC (*E. coli* enteroinvasiva) ocorram em todo o mundo, elas são particularmente habituais em países de baixa renda, onde a falta de saneamento e outros problemas relacionados à higiene e deficiência na saúde

pública geral favorece sua disseminação, já que sua principal via de transmissão ocorre fecal-oral (PASQUA *et al.*, 2018).

Quadro 1. Cepas patogênicas de *Escherichia coli*

<b>Grupo</b>	<b>Sorogrupos</b>	<b>Toxinas</b>	<b>Sintomas da doença</b>
<b>Enterotoxigênica (ETEC)</b>	O6, O8, O15, O20, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139, O148, O153, O159, O167	Termossensível e similar à toxina da cólera, atua nas células mucoides; Termoestável	Diarreia do tipo cólera, mas em geral menos grave
<b>Enteropatogênica (EPEC)</b>	O18, O44, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142	Não aparente	Diarreia infantil e vômito
<b>Enteroinvasiva (EIEC)</b>	O124, O143, O152	Shigatoxinas não detectadas	Espalham-se de célula a célula, a doença é semelhante a disenteria
<b>Entero-hemorrágica (EHEC)</b>	O6, O26, O46, O48, O91, O98, O111, O112, O146, O157, O165	Verocitotóxica, semelhante a shigatoxina	Diarreia sanguinolenta; Colite hemorrágica; Pode progredir para síndrome urêmica hemolítica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP).
<b>Enteroagregativa (EAEC)</b>	Ampla variação nos sorotipos	Toxina termoestável; Hemolisina; Verocitotoxina relada em algumas cepas	Diarreia; Algumas cepas têm sido descritas como causadoras de HUS.

Fonte: adaptado de Forsythe (2013).



### 3.2.2 Resistência microbiana

Nas últimas décadas, o uso inadequado de agentes antimicrobianos para diferentes finalidades, terapêuticos e profiláticos, por exemplo, levou ao aparecimento de uma consequência indesejada: o chamado fenômeno de resistência antimicrobiana (RAM), tanto no caso de bactérias comensais quanto de bactérias que ameaçam a saúde pública (IMRE *et al.*, 2022). A RAM ocorre quando microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) sofrem alterações quando expostos a antimicrobianos como antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos ou anti-helmínticos (WHO, 2017).

A mastite bovina, inflamação do úbere comumente associada à infecção bacteriana, é reconhecida como a causa raiz do uso de compostos antimicrobianos em fazendas leiteiras em todo o mundo, levando a perdas financeiras consideráveis para agricultores e a potencial seleção e introdução de genes codificados de RAM e bactérias associadas em ambientes de produção de leite e seus derivados lácteos (NIKOLOUDAKI *et al.*, 2021; RUBIOLA *et al.*, 2022).

À medida que os grandes produtores controlam e gerenciam mais de perto os casos de mastite em seus rebanhos leiteiros, há maior pressão para a seleção de linhagens resistentes nessas fazendas. Estudos demonstram que 60% dos isolados de EPEC no leite de grandes produtores foram resistentes a pelo menos um antibiótico enquanto apenas 26,6% dos isolados de EPEC do leite de pequenos produtores apresentaram resistência (TEMAKI *et al.*, 2005; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2019).

Bactérias resistentes aos antimicrobianos têm a capacidade de difundir a resistência antimicrobiana através da transferência horizontal de genes, que permite a mobilização dos genes de resistência entre bactérias (AMOS *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2019). Os microrganismos resistentes à maioria dos antimicrobianos são conhecidos como multirresistentes. A multirresistência em *E. coli* é uma questão preocupante, cada vez mais observada na medicina humana e na medicina veterinária, por todo o globo (POIREL *et al.*, 2018).

Animais cujas infecções estejam atreladas a *E. coli* ou outros microrganismos, são submetidos a diversos tratamentos com antimicrobianos, incluindo ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas ou oxitetraciclinas ambos amplamente utilizados para tratamento de mastite bovina, por exemplo (POIREL *et al.*, 2018). Além disso, cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas também são amplamente

indicadas para tratamentos por meio de administração sistêmica ou local, a depender da gravidade dos sintomas clínicos (SUOJALA; KAARTINEN; PYÖRÄLÄ, 2013).

Os mecanismos mais problemáticos em *E. coli* correspondem a aquisição de genes que codificam para  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (conferindo resistência a cefalosporinas de amplo espectro), carbapenemases (conferindo resistência a carbapenêmicos), 16S rRNA metilases (conferindo pan-resistência a aminoglicosídeos), genes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR) (que conferem resistência a [fluoro]quinolonas) e genes *mcr* (que conferem resistência a polimixinas) (POIREL *et al.*, 2018).

Um dos principais mecanismos de resistência desenvolvido por *E. coli* para se adaptar ao antibiótico é a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico por meio de enzimas, denominadas como beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Este mecanismo permite que o microrganismo resista à classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (PARUSSOLO *et al.*, 2018), contudo não são capazes de hidrolisar cefamicinas e carbapênemicos.

Uma vez resistente a beta-lactâmicos as cepas de *E. coli* tornaram-se uma complicação global emergente já que os carbapenêmicos têm sido uma das principais opções de terapia para as infecções humanas, incluindo as causadas por bactérias produtoras de ESBL (PARUSSOLO *et al.*, 2018).

Os genes de resistência comuns para *E. coli* obtidos nos Estados Unidos em casos de mastite bovina segundo relatórios citados por Wang (2020) e Srinivasan (2007), são *ampC*, *tetA*, *tetB*, *strA*, *strB*, *sull* e *sulll* (SRINIVASAN *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020). Já no México, sete genes, incluindo *blaCTX-M*, *tetA*, *tetB*, *strA*, *strB* e trimetoprim-sulfametoxazol foram detectados em cerca de 80% dos isolados (MEJIA *et al.*, 2017). A caracterização genética da bactéria causadora de mastite é vital para a seleção de agente microbianos adequados durante uso e tratamento (WANG *et al.*, 2020). O Quadro 2, traz um breve resumo de estudos recentes que pesquisaram o perfil genotípico de resistência de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos.

Quadro 2. Estudos que investigaram genes de resistência de *E. coli* isolada em leite e produtos lácteos

Produto e localização	Técnica utilizada	Perfil Genotípico	Referência
Produtos lácteos artesanais e pasteurizados (leite fervido e pasteurizado, queijo, kashk, iogurte, sorvete, manteiga, queijo para pizza, creme e doogh) e leite cru.  Isfahan, Irã	Extração de DNA genômico. PCR na investigação de patótipos e seus genes: EPEC ( <i>bfpA</i> + <i>eaeA</i> ), EPEC ( <i>eaeA</i> ), ETEC ( <i>lt</i> e <i>st</i> ), EIEC ( <i>ial</i> ) e STEC ( <i>stx2</i> )	EPEC foi o patótipo mais comum, 37,0% dos isolados, presença dos genes <i>eaeA</i> e <i>bfpA</i> . ETEC e EIEC, foi detectada em 13%, com a presença de genes relacionados. O gene <i>stx2</i> (STEC) foi identificado em 7,40%. Ausência do patótipo EAEC.	MADANI <i>et al.</i> , 2022
Queijo produzido a partir de leite cru (leite de vaca e ovelha).  Região de Banat, Romênia	PCR uniplex convencional. Investigação de <i>E. coli</i> enterohemorrágica: <i>stx1</i> (Shiga toxina 1) e <i>stx2</i> (Shiga toxina 2).	9,3% abrigaram os genes de virulência <i>stx2</i> e 2,3% <i>stx1</i> . A biovariedade <i>E. coli</i> O157 (incluindo H7) identificada em 7%.	IMRE <i>et al.</i> , 2022
Leite cru, queijo branco macio (Kereish e Domiati), iogurte e Laban Rayeb.  Mansoura, Egito	Identificação sorológica pra determinação de patótipos.	Patótipo EHEC (O103:H2, O26:H11, O111:H2, O91:H21, O117:H4, O86) encontrado em todos os produtos. EPEC (O18:H7) em leite cru e Laban Rayeb, ETEC (O127:H6) em leite cru e queijo Kareish, EAEC (O44:H18) e EIEC (O159) em leite cru.	IBRAHIM <i>et al.</i> , 2022

Quadro 3. Estudos que investigaram genes de resistência de *E. coli* isolada em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Técnica utilizada	Perfil Genotípico	Referência
Leite cru. Região norte (Jinan, Harbin, Pequim e Hohhot), China	PCR investigando <i>stx1</i> e <i>stx2</i> (STEC), <i>estA</i> , <i>estB</i> e <i>eltB</i> (ETEC), <i>aggR</i> (EAEC), <i>bfp</i> e <i>eae</i> (EPEC) e <i>ipaH</i> (EIEC). Para genes de resistência β-lactamase ( <i>blaSHV</i> , <i>blaCMY</i> , <i>blaCTX-M</i> e <i>blaTEM</i> ) e dois genes de tetraciclina ( <i>tetA</i> e <i>tetB</i> ).	<i>stx1</i> foi o gene mais prevalente (9%), seguido por <i>eae</i> (4,5%), <i>estB</i> (3%), <i>stx2</i> (1,5%), <i>estA</i> (1,5%), <i>elt</i> (1,5%) e <i>ipaH</i> (1,5%). <i>aggR</i> e o <i>bfp</i> não foram detectados. <i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i> (1,5%), <i>blaCMY</i> (10,4%) e <i>blaCTX-M</i> (20,9%). Presença <i>tetB</i> e ausência de <i>tetA</i> .	LIU <i>et al.</i> , 2021
Leite cru de bovinos com mastite. Províncias de Heilongjiang e Mongólia Interior; Hebei, Pequim, Tianjin e Shandong; Xinjiang; Xangai, Jiangxi, Anhui e Sichuan, China	PCR investigando aminoglicosídeos: <i>aadA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(3)-III</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(3)-I</i> , <i>aph(3)-II</i> . Anfenicóis: <i>catI</i> , <i>catII</i> , <i>catIII</i> , <i>cmlA</i> . β-lactâmicos: <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaCTX-M</i> . Tetraciclinas: <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> . Sulfonamidas: <i>sulI</i> , <i>sulII</i> . Trimetoprima: <i>dhfrI</i> , <i>dhfrIV</i> , <i>dhfrXIII</i> . Eritromicina: <i>ereA</i> e quinolonas: <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrS</i> ,	<i>blaTEM</i> (83,1%), seguidos por <i>blaCTX-M</i> (66,3%), <i>sulI</i> (44,6%), <i>sulII</i> (32,5%), <i>aph(3)-II</i> (34,9%) e <i>aph(3)-I</i> (30,1%). As taxas de detecção para os genes restantes foram todas abaixo de 30%.	WANG <i>et al.</i> , 2020
Queijo Minas Frescal. Rio de Janeiro, Brasil.	PCR avaliando: <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaOXA</i> . <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , Classes 1 e 2 de integrons.	<i>blaTEM</i> (100%), <i>blaSHV</i> (6,7%) e <i>tetB</i> (6,7%). 46,6% amplificaram para uma ou mais classes de integrons.	PIRES <i>et al.</i> , 2019.

Quadro 4. Estudos que investigaram genes de resistência de *E. coli* isolada em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Técnica utilizada	Perfil Genotípico	Referência
Queijo Minas Frescal e Leite cru.  Estados do Sul (Paraná) e Nordeste (Maranhão), Brasil	Extração de DNA e amplificação do gene <i>eaeA</i> (EPEC) e <i>stx1</i> e <i>stx2</i> (STEC), EHEC presença simultânea de <i>eaeA</i> e <i>stx1</i> ou <i>stx2</i> . Após identificação, submetidos a nova PCR para verificar presença do gene <i>bfpA</i> .	Ausência de <i>stx1</i> ou <i>stx2</i> (STEC). 9,75 de leite cru positivos para EPEC. Em relação às amostras de queijo, 1,8% Cepas provenientes do queijo minas frescal positivo para EPEC e STEC. Nenhum isolado caracterizado como EHEC. O gene <i>bfpA</i> detectado (t-EPEC) em 70%.	RIBEIRO JÚNIOR <i>et al.</i> , 2019
Leite Cru e queijo produzido a partir de leite cru (Karish e Ras).  Região Delta do Nilo: Menofia e El Beheira Governorates, Egito	PCR para genes de resistência à tetraciclina ( <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> e <i>tetD</i> ), β-lactâmicos ( <i>blaCTX-M</i> , <i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i> ), aminoglicosídeos ( <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA</i> e <i>aphA1</i> , sulfonamida ( <i>suII</i> , <i>suIII</i> e <i>suIV</i> ). Sequenciamento de integron classe 1.	Tetraciclinas: <i>tetA</i> (86,9%), <i>tetB</i> (14,8%), <i>tetD</i> (1,63%), <i>tetC</i> (0,0%). β-lactâmicos: <i>blaTEM</i> (95,2%), <i>blaCTX-M</i> (21,4%), <i>blaSHV</i> (7,14%). Estreptomicina: <i>strA</i> e <i>strB</i> (100,0%). Canamicina: <i>aadA</i> (26,8%) e <i>aphA1</i> (100,0%). Sulfonamidas: <i>suIII</i> (100,0%), <i>suII</i> (28,0%) e <i>suIV</i> (12,0%). Quatro isolados apresentaram <i>dfrA12/orfF/aadA2</i> , dois tinham <i>aadA22</i> e um tinha <i>dfrA1/aadA1</i> .	OMBARAK <i>et al.</i> , 2018
Leite cru e Queijo Artesanal Serrano.  Região Serrana de Santa Catarina, Brasil	PCR para os genes: <i>eae</i> , <i>st</i> , <i>lt</i> , <i>aggR</i> , <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaCTX-M</i> grupo 1, 2 e 9, <i>blaOXA-48</i> ,	Confirmados: EPEC (12,82%) presença do gene <i>eae</i> , ETEC (6,84%) gene <i>st</i> e/ou <i>lt</i> e EAEC (1,71%) gene <i>aggR</i> . 3,42% positivas para o fenótipo ESBL e abrigava o gene <i>blaTEM</i> . Ausência de <i>E. coli</i> produtora de carbapenemases.	PARUSSOLO <i>et al.</i> , 2018

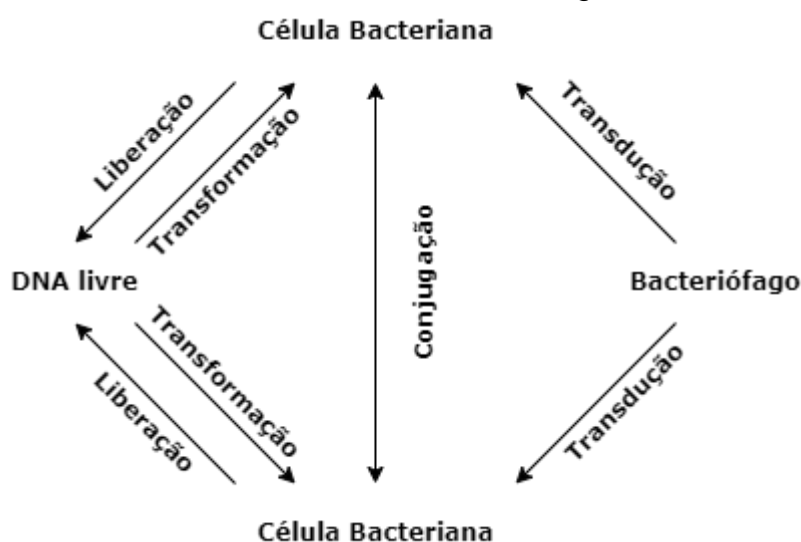
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A aquisição e a transferência de genes de resistência aos antimicrobianos, associados à seleção exercida pelo uso intensivo destas substâncias na criação animal destinada ao consumo humano, corroboram a importância e a necessidade de avaliar-se a presença de bactérias resistentes à antibióticos nos alimentos (CARDOSO; MARIN, 2014; PIRES et al., 2019).

Nas últimas décadas, um número crescente de genes de resistência foi identificado em isolados de *E. coli*, de modo que, muitos desses genes foram adquiridos por transferência horizontal de genes. No *pool* de genes enterobacterianos, esta bactéria pode atuar tanto como doadora como receptora de genes de resistência, ou seja, pode adquirir genes de resistência de outras bactérias, mas também pode transmitir seus genes de resistência (POIREL et al., 2018).

Os elementos genéticos móveis desempenham um papel fundamental na transferência horizontal de genes de resistência entre células bacterianas. A presença de elementos móveis altamente organizados, como plasmídeos e transposons em genomas bacterianos, indica uma potencial transferência de material genético, incluindo os genes que codificam resistência a antibióticos (ZARZECKA et al., 2020), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Mecanismos horizontais de transferência de genes de resistência.



Fonte: adaptado de ZARZECKA et al. (2020)

Outros elementos móveis, como transposons e cassetes de genes em integrons de classe 1 e classe 2, parecem desempenhar um importante papel na

disseminação de genes de resistência (POIREL *et al.*, 2018). Elementos genéticos móveis simples, por exemplo, como as sequências de inserção, capazes de transposição autônoma, também estão associados com aos genes de resistência a antibióticos (FRAQUEZA, 2015).

Os integrons são encontrados no genoma de centenas de bactérias, desempenham um papel importante na aquisição e difusão de genes de resistência a antibióticos entre patógenos Gram-negativos (GUERIN *et al.*, 2009), devido à sua capacidade de capturar os cassetes de genes no ambiente e incorporá-los por recombinação específica do local (YAGOOB *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2019).

### **3.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *E. coli* ISOLADOS DE LEITE CRU E PRODUTOS LÁCTEOS**

Durante muitos anos, os estudos sobre resistência antimicrobiana e a disseminação de agentes infecciosos resistentes focaram principalmente em isolados clínicos (ARAGÃO *et al.*, 2022). Todavia, pesquisas revelam dinâmicas diferenciadas na cadeia produtiva de alimentos, sendo considerada uma importante via de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2020; ARAGÃO *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana pode ser determinada utilizando o método fenotípico qualitativo de discos difusão de Kirby-Bauer, também conhecido por disco-difusão, conforme recomendado pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCast). Este método é uma das abordagens mais antigas e difundidas para testes de sensibilidade aos antimicrobianos e, ainda hoje, amplamente utilizado em rotinas laboratoriais, sendo adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos (BrCast, 2021). Geralmente, utiliza-se a cepa de *Escherichia coli* ATCC como controle de qualidade (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2019), como esta cepa tem características bem definidas e conhecidas é utilizada como padrão para avaliar a precisão e a sensibilidade nos testes de sensibilidade à antimicrobianos.

Após confirmada a resistência, os genes de resistência e virulência podem ser detectados e caracterizados por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo este um método genotípico realizado por meio de *primers* e reações. Os ensaios de PCR são capazes de demonstrar o perfil gênico de virulência das cepas (ALTALHI; HASSAN, 2009; PARUSSOLO *et al.*, 2019).

A resistência a antibióticos, em especial *E. coli* isolada de produtos lácteos, vem sendo foco de um número crescente de estudos nos últimos anos, não apenas em produtos brasileiros (PARUSSOLO *et al.*, 2019; PIRES *et al.*, 2019; RESENDE *et al.*, 2021) mas em todo o mundo (MADANI *et al.*, 2022; IBRAHIM *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020; OMBARAK *et al.*, 2018). Abaixo (Quadro 3), encontra-se um compilado de estudos recentes e principais dados quanto à resistência a antimicrobianos isolados de leite cru e/ou e produtos lácteos.



Quadro 5. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos

Produto e localização	Número de amostras e/ou isolados	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Produtos lácteos artesanais e pasteurizados (leite fervido e pasteurizado, queijo, kashk, iogurte, sorvete, manteiga, queijo para pizza, creme e doogh) e leite cru.  Isfahan, Irã	Avaliados 110 e 90 amostras de laticínios tradicionais e pasteurizados, respectivamente.	Método de disco de difusão de Kirby-Bauer.	AMP (10 µg), AMK (30 µg), CFO (30 µg), CTX (30 µg), CRO (30 µg), CLO (30 µg), (CIP (5 µg), GEN (10 µg), KAN (30 µg), NAL 30 µg), TET (30 µg), EST (10 µg), SXT (125/23,75 µg) e AMC (20/10 µg),	Dos 38 isolados virulentos, 16 foram considerados multirresistentes. Todos os isolados foram susceptíveis à AMK. A suscetibilidade à GEN foi estimada em 97,4%, CFO (89,5%), AMC (86,8%) e CLO (86,8%). A maior resistência foi observada contra a EST (57,9%), seguida pela TET (50%).	MADANI et al., 2022
Leite cru, queijo branco macio (Kereish e Domiati), iogurte e Laban Rayeb.  Mansoura, Egito	Cerca de 200 amostras foram coletadas para avaliação. 56 cepas, passaram por testes de sensibilidade a antimicrobianos	Método de disco de difusão de Kirby-Bauer.	Foram testados os seguintes antibióticos: NAL (30 ug), CIP (5 ug), TET (30 ug), PCN G (10 UI), CFO (C, 30 ug), ERY (E, 15 ug), OX (1 ug), IPM (10 ug), LVX (5 ug), CRO (30 ug), CTX (30 ug), CPM (30 ug), AMP (10 ug), AMK (30 ug), GEN (10 ug), MER (10 ug), CZ (30 ug) e SFT (25 ug).	A maior resistência foi encontrada para a ERY (100%), seguida pela OX (94%), CPM (82%), PCN G (76,5%), CRO (70,5%), AMP e CTX (58,5%), NAL (52,9%), CZ (47,1%), TET e SFT (41,2%)	IBRAHIM et al., 2022

Quadro 6. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Número de amostras e/ou isolados	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Queijo produzido a partir de leite cru (leite de vaca e de ovelha).  Região de Banat, Romênia	avaliados 43 isolados <i>E. coli</i> , sendo 28 avaliados para antimicrobianos de uso humano e 15 isolados avaliados para antimicrobianos de uso animal.	O padrão de resistência das cepas isoladas foi determinado utilizando o equipamento automático Vitek2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Dois diferentes cartões foram utilizados AST-N204 (para uso humano) e AST-GN96 (para uso veterinário).	AMP ( 4, 8 32 µg), AMC (4/2, 16/8, 32/16 µg), TZP (2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8 µg), TIM (8/2, 32/2, 64/2 µg), AMK (8, 16, 64 µg), GEN (4, 16, 32 µg), NEO (8, 16, 64 µg), FFC (1, 4, 8 µg); ERT (0,5, 1, 6 µg), MER (0,5, 2, 6, 12 µg), IPM (1, 2, 6, 12 µg), CTX (1, 4, 16, 32 µg), CAZ (1, 2, 8, 32 µg), CPM (2, 8, 16, 32 µg), LEX (8, 32, 64 µg), CEF (2, 8, 32 µg), TIO; 1, 2µg), CEQ (0,5, 1,5, 4 µg), CIP (0,5, 2, 4 µg), NOR (1, 8, 32 µg), ENR (0,25, 1, 4 µg), MBX (1, 2µg), UB (2, 4, 8 µg), NIT (16, 32, 64 µg), FOF (8, 16, 328 µg), SXT (1/19, 4/76, 16/304 µg); e TET ( 2, 4, 8 µg).	Resultados do teste de resistência de 28 cepas testadas no cartão AST-N204: AMP (42,8%), NEM (28,6%), AMC (25,0%), FOF (25,0%), SXT (10,7%), TZP (7,1%), CTX (7,1%), CPM (7,1%) ERT (3,6) e CAZ (3,6%). Nenhum dos isolados foi resistente a AMK, GEN, CIP, MER, IPM e NIT. O restante dos isolados ( n= 15), testados com o cartão AST-GN96, eram resistentes a ENR (100%), AMP (33,3%), AMC (20,0%), LEX (20%), CEQ (13,3%), TET (13,3%), TIM (6,7%), FFC (6,7%) e SXT (6,7%), todos os isolados foram suscetíveis a GEN, TIO, CEF, MBX e UB. Da mesma forma, notáveis taxas de suscetibilidade foram registradas para IPM (93,3%) e NEO (93,3%).	IMRE et al., 2022

Quadro 7. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Número de amostras e/ou isolados	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Leite cru. Região norte (Jinan, Harbin, Pequim e Hohhot), China	Avaliadas 195 amostras. Isoladas 67 cepas de <i>E. coli</i>	Método de difusão de disco de Kirby-Bauer.	GEN (10µg), TOB (10µg), EST (10µg), AMC (20/10µg), AMP (10µg), CIP (5µg), AZM (15µg), CFO (30µg), CLO (30µg), TET (30µg), KAN (30µg) e SXT (1,25/23,75µg)	Foram observadas resistência antibiótica à: AMP (46,3%), AMC (16,4%), TET (13,4%), SXT (13,4%), CFO (11,9%), CLO (7,5%), KAN (7,5%), EST (6,0%), TOB (4,5%), AZM (4,5%), CIP (1,5%) e GEN (0,0%). E 19,4% dos isolados foram resistentes a mais de três tipos de antibióticos.	LIU et al., 2021
Leite cru de bovinos com mastite. Províncias de Heilongjiang e Mongólia Interior; Hebei, Pequim, Tianjin e Shandong; Xinjiang; Xangai, Jiangxi, Anhui e Sichuan, China	Avaliadas de 750 amostras de leite cru bovino. 83 cepas de <i>E. coli</i> foram isoladas.	Método de difusão de disco de Kirby-Bauer.	SCF (75 µg), CTX (30 µg), PCN (10 µg), AML (10 µg), AMP (10 µg), CFO (30 µg), (ERY (15 µg), OX (1 µg), CEF (30 µg), CIP (5 µg), AZM (15 µg), ASP (30 µg), ENR (5 µg), NOR (10 µg), OFX (5 µg), TET (30 µg), TMP (5 µg), DOX (30 µg), GEN (10 µg), EST (10 µg), SFT (300 µg), TOB (10 µg), NEO (30 µg), SH (100 µg), AMK (30 µg), LMY (2 µg), KAN (30 µg), CLO (30 µg) e CLI (2 mg).	PCN (100%), ASP (100%), OX (98,8%), LMY (98,8%), SFT (53%) e AMP (30,1%), AML (25,3%), CTX (18,1%), SCF (15,7%), CFO (6,0%), ERY (14,5%), AZM (2,4%), CIP (4,8%), ENR (4,8%), NOR (4,8%), OFX (4,8%), DOX (13,3%), TET (12,0%), TMP (22,9%), EST (13,3%), GEN (12,0%), KAN (4,8%), AMK (2,4%), TOB (1,2%), NEO (1,2%), SH (0,0%), CLI (26,5%) e CLO (10,8%).	WANG et al., 2020

Quadro 8. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Número de amostras e/ou isolados	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Queijo Minas Frescal. Rio de Janeiro, Brasil.	30 isolados de <i>E. coli</i> foram avaliados	Método de difusão de disco de Kirby-Bauer.	AMP (10 µg), AMC (20/10 µg), AMS (10/10 µg), TET (30 µg), CFO (30 µg), CRO (30 µg), CAZ (30 µg), CPM (30 µg), CIP (5 µg), NAL (30 µg), IPM (10 µg), ERT (10 µg), GEN (10 µg), AMK (30 µg), EST (10 µg), SFT (30 µg) e CLO (30 µg).	AMP (30,0%), NAL (23,3%), CFO (16,7%), EST (16,7%), CRO (13,3%), TET (10,0%), IPM (10,0%), AMC (10,0%), CPM (6,7%), ERT (6,7%), CAZ (6,7%), AMK (3,0%), AMS (3,0%) e SFT (3,0%).  50% dos isolados, apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos.	PIRES et al., 2019.
Queijo Minas Frescal e Leite cru. Estados do Sul (Paraná) e Nordeste (Maranhão), Brasil	319 isolados provenientes de 70 amostras de leite cru coletadas no Paraná e no Maranhão e 10 amostras de queijo minas frescal coletados Londrina.	Método de difusão de disco de Kirby-Bauer.	AMC (30 µg), ATM (30 µg), TET (30 µg), CTX (30 µg), CFO (30 µg), NAL (30 µg), GEN (10 µg), CLO (30 µg), AMP (10 µg), ENR (5 µg), CIP (5 µg) e EST (10 µg).	Das 20 cepas isoladas em leite cru, apresentaram resistência a AMP (10,0%), TET (15,0%), EST (25,0%), NAL (5,0%) e CFO (10,0%). As 5 cepas isoladas do queijo minas frescal apresentaram o seguinte perfil de resistência: AMP (20,0%), EST (40,0%), TET (40,0%) e CFO (20,0%).	RIBEIRO JÚNIOR et al., 2019

Quadro 9. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos (continuação)

Produto e localização	Número de amostras e/ou isolados	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Leite cru e Queijo Artesanal Serrano. Região Serrana de Santa Catarina, Brasil	117 isolados de <i>E. coli</i> foram avaliados	Método de disco de difusão de Kirby-Bauer.	AMC (20/10µg), ATM (30µg), CPM (30µg), CAZ (30µg), CRO (30µg), CTX (30µg), MER (10µg), IPM (10µg), CFO (30µg), AMP (10µg), TET (30µg), DOX (10µg), CIP (5µg), NOR (10µg), LVX (5µg), TOB (10µg), GEN (10µg), AMK (30µg), EST (10µg), CLO (30µg), SXT (1,25/23,75µg) e NIT (300µg).	Em geral, 62 isolados (52,99%) foram considerados suscetíveis aos antimicrobianos testados. Todos os isolados foram suscetíveis a MER, NOR, LVX, TOB, AMK e CLO. Um total de 10 isolados (8,55%), todos originários de amostras de queijo, exibiram um perfil de multirresistência. Os isolados apresentaram resistência para os seguintes antimicrobianos: AMC (3,68%), ATM (2,56%), CPM (0,85%), CAZ (1,71%), CRO (2,56%), CTX (2,56%), CFO (13,68%), AMP (17,10%), TET (15,38%), DOX (14,53%), EST (8,55%), SXT (6,84%) e NIT (1,71%). 3 isolados apresentaram resistência intermediária ao IPM (2,56%).	PARUSSOLO et al., 2018

Quadro 10. Estudos que apontam resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas em leite e produtos lácteos (conclusão)

Produto e localização	Número de amostras	Técnica utilizada	Antibióticos testados*	Resultados Resistência Antimicrobiana	Referência
Leite Cru e queijo produzido a partir de leite cru (Karish e Ras).  Região Delta do Nilo: Menofia e El Beheira Governorates, Egito	222 isolados de <i>E. coli</i> foram avaliados	Método de disco de difusão de Kirby-Bauer.	AMP (10 µg), CTX (30 µg), CAZ (30 µg), CTX-CLA (30 µg/ 10 µg), CAZ-CL (30 µg/10 µg), IPM (30 µg), KAN (30 µg), EST (10 µg), TET (30 µg), CIP (5 µg), NAL (30 µg), SXT (1,25 µg/23,75 µg), CLO (30 µg) e FOF (50 µg).	Dos 222 isolados, 66 (29,7%) eram resistentes a um ou mais antimicrobianos. Desses 66 isolados, 33 apresentaram multirresistência. Em termos gerais, os isolados apresentaram resistência a TET (27,5%), AMP (18,9%), EST (18,5%), SXT (11,3%), CTX (4,5%), KAN (4,1%), CAZ (3,6%), CLO (2,3%), NAL (1,8%) e CIP (1,4%). Nenhum deles foi resistente a FOF e IPM.	OMBARAK et al., 2018

\*AMP = Ampicilina; ASP = Acetilspiramicina; AMS = Ampicilina-Sulbactam; AMK = Amicacina; ATM = Aztreonam; AZM = Azitromicina; AMC = Amoxicilina-Ácido clavulânico; AML = Amoxicilina; CTX = Cefotaxima; CTX-CLA = Cefotaxima-Ácido clavulânico; CPM = Cefepima; CAZ = Ceftazidima; CAZ-CLA = Ceftazidima-Ácido clavulânico; CRO = Ceftriaxona; CZ = Cefazolina; CFO = Cefoxitina; CLO = Cloranfenicol; CIP = Ciprofloxacina; CEF = Cefalotina; CEQ = Cefquinoma; CLI = Clindamicina; DOX = Doxiciclina; EST = Estreptomicina; ERT = Ertapenem; ERY = Eritromicina; ENR = Enrofloxacinina; FOF = Fosfomicina; FFC = Florfenicol; GEN = Gentamicina; IPM = Imipenem; KAN = Canamicina; NAL = Ácido nalidíxico; LMY = Lincomicina; LVX = Levofloxacina; LEX = Cefalexina; MBX = Marbofloxacina; MER = Meropenem; NEO = Neomicina; NIT = Nitrofurantoína; NOR = Norfloxacinina; OX = Oxacilina; OFX = Ofloxacina; PCN = Penicilina; SH = Espectinomicina; SFT = Sulfametoxazol; SCF = Cefoperazona; SXT = Trimetoprim-Sulfametoxazol; TET = Tetraciclina; TOB = Tobramicina; TMP = Trimetoprima; TZP = Piperacilina-tazobactam; TIO = Ceftiofur; TIM = Ticarcilina/ácido clavulânico; UB = Flumequina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

As amostras de queijo colonial artesanal foram obtidas de um produtor local da região oeste de Santa Catarina, município de Seara. Foram coletadas três amostras em janeiro de 2022 e duas amostras em janeiro de 2023, com tempos de maturação diferentes, conforme listado abaixo (Tabela 1). Após coletadas, as amostras foram transportadas em caixa térmica e mantidas sob refrigeração em sua embalagem original até o momento da investigação da comunidade bacteriana.

Tabela 1. Dados das amostras de queijo colonial artesanal coletadas

Data da coleta	Dados da amostra	
	Tempo de maturação	Identificação
Janeiro, 2022	7 dias	RGD7
	21 dias	RGD21
Janeiro, 2023	1 dia	RG1
	7 dias	RG7
	15 dias	RP15

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

### 4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para as análises retirou-se uma alíquota de 25 g de cada amostra e transferiu-se para *bag* estéril onde acrescentou-se 225 ml de água peptonada (0,1%), e utilizou-se esta fração para as diluições decimais seriadas seguintes. Posteriormente, as amostras em suas respectivas diluições foram inoculadas de acordo o método ABNT NBR ISO 4833:2015 para contagem de mesófilos aeróbios totais (ISO, 2015), contagem de bolores e leveduras de acordo a ISO 21527-1:2008 (ISO, 2008), contagem de Estafilococos coagulase positiva segundo a metodologia proposta pela ISO 6888-1:2016 (ISO, 2016). A pesquisa de enterotoxina estafilocócica foi realizada de acordo com o método AOAC OMA, 2019 (AOAC, 2019), por fim, a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram utilizados os métodos descritos na AOAC 2004.2:2019 (AOAC, 2019) e AOAC OMA, 2019 (AOAC, 2019), respectivamente.

#### **4.2.1 Isolamento de *E. coli***

As amostras em suas respectivas diluições foram inoculadas em ágar TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide), meio seletivo para contagem de *Escherichia coli*  $\beta$ -D-glucuronidase positiva e incubadas por 24 horas a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ , de acordo com o método ISO 16649-2:2022 (ISO, 2022). Foram selecionados de 5 à 20 colônias típicas em diferentes diluições de cada amostra para determinação do perfil de resistência. Estas foram transferidas para caldo BHI (Brain Heart Infusion) em microtubos e incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24h.

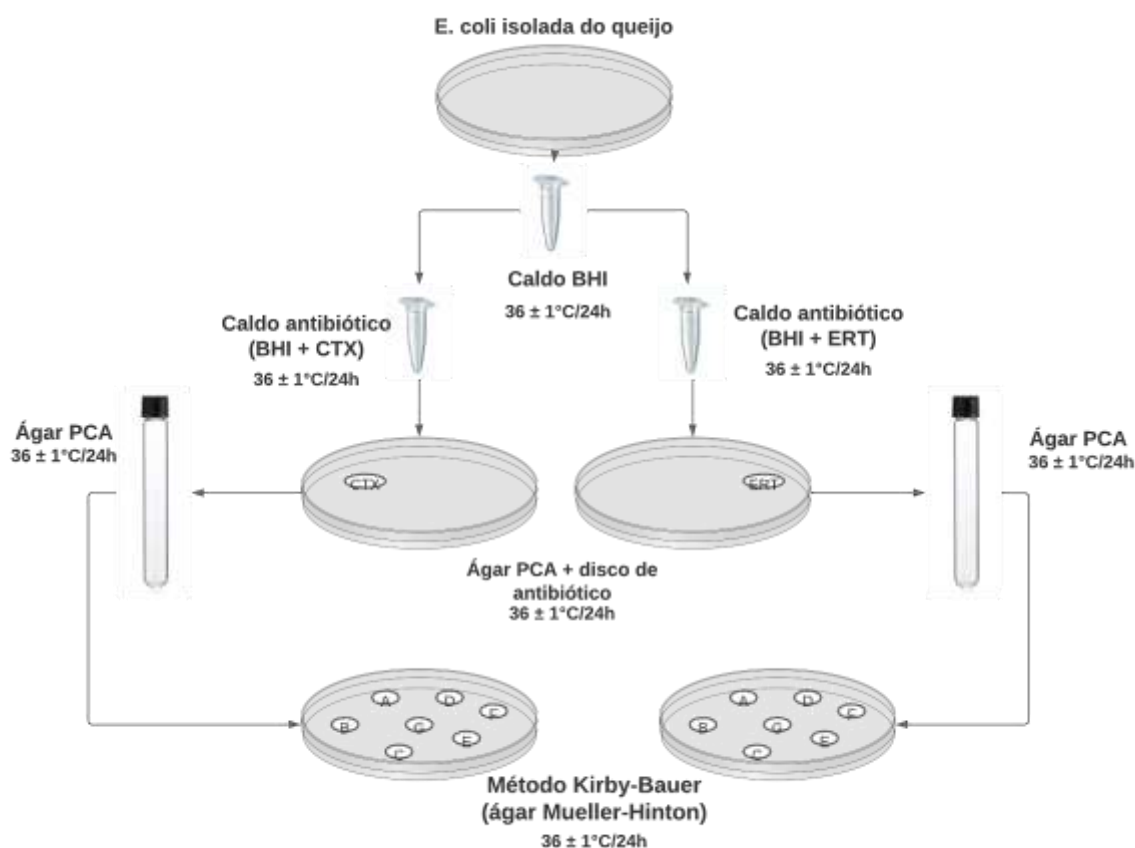
Todas as supostas colônias de *E. coli* passaram por confirmação baseada no teste bioquímico com reativo de Kovacs, este é indicado para detecção da produção de indol pelas enterobactérias a partir de triptofano (BRASIL, 2013a). As colônias duvidosas foram submetidas a uma série de testes bioquímicos complementares: teste do vermelho metila (VM), teste do Voges-Proskauer (VP) e ágar citrato de Simmons (BRASIL, 2013a).

#### **4.2.2 Seleção de cepas resistentes**

Para garantir a testagem de cepas com pré-disposição à resistência, as colônias selecionadas passaram por duas pressões seletivas, conforme ilustrado na Figura 4. A pressão seletiva consiste em colocar o microrganismo em contato prévio com o antibiótico antes de realizar o antibiograma, a fim de selecionar cepas que demonstram resistência prévia aos antibióticos escolhidos. Estes são determinados com base em estudos atuais que vem apontando resistência comum do microrganismo para com aquele antimicrobiano. Para o presente trabalho, utilizou-se cefotaxima (CTX, 30 $\mu\text{g}$ ) e ertapenem (ERT, 10 $\mu\text{g}$ ).



Figura 4. Esquema da metodologia utilizada para a realização da seleção de potenciais cepas resistentes.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

#### 4.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) por meio do método qualitativo de Kirby-Bauer

Para preparar os inóculos bacterianos, transferiu-se as colônias previamente isoladas em tubo inclinado contendo PCA (*Plate Count Agar*) e inoculou-as em meio nutriente (BHI) *overnight* à  $36 \pm 1$  °C. Após, o inóculo foi padronizado em solução salina (0,85%, m/v) esterilizada para obter uma suspensão com turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland, ajustada em espectrofotômetro a 625nm.

Para inoculação, umedeceu-se um *swab* de algodão estéril na suspensão bacteriana, girando e pressionando o *swab* na parede interna do tubo para retirar o excesso de líquido antes de efetuar a semeadura nas placas contendo ágar Mueller-Hinton. Após a inoculação, a placa foi mantida em temperatura ambiente para secar por cerca de 10-15 minutos, garantindo que todo o excesso de inóculo tenha sido absorvido antes da aplicação dos discos contendo os antimicrobianos, conforme

descrito por Brasil (2020). Com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de antibióticos foram aplicados na superfície da placa. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada para controle de qualidade a fim de validar os resultados e identificar previamente qualquer contaminação por meio do crescimento inadequado da cepa controle.

Com base no BrCast (2022) e Quadro 3, para o estudo do perfil antimicrobiano de *E. coli* isolados de queijo colonial artesanal foram selecionados 16 antibióticos de 7 diferentes classes para avaliação, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Antibióticos utilizados no teste de sensibilidade antimicrobiana

Classe	Antibiótico	Conteúdo do disco (µg)
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	10
	Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC)	30
Cefalosporinas	Cefepime (CPM)	30
	Ceftadizima (CAZ)	30
	Cefotaxima (CTX)	30
	Cefoxitina (CFO)	30
	Ertapenem (ERT)	10
Carbapenêmicos	Meropenem (MPM)	10
	Imipenem (IPM)	10
	Ciprofloxacina (CIP)	5
Fluoroquinolonas	Ácido nalidíxico (NAL)	30
	Norfloxacina (NOR)	10
Aminoglicosídeos	Amicacina (AMI)	30
	Gentamicina (GEN)	10
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET)	30
Agentes Diversos	Sulfametoxazol-trimetoprima (SUT)	25

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

*E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) foi investigada utilizando o teste de difusão em disco duplo para amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX) e ceftadzima (CAZ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os resultados obtidos a partir das análises microbiológicas para mesófilos aeróbicos, bolores e leveduras, bactérias ácido lácticas, *E. coli* e Estafilococos coagulase positiva estão apresentados na Tabela 3. Os patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. estavam ausentes nas amostras avaliadas, de acordo com o exigido pela legislação brasileira para estes microrganismos (BRASIL, 2022). Todas as amostras estão de acordo com o limite máximo aceitável estipulado pela IN 161/22 para Estafilococos coagulase positiva, inferior a 3 log UFC/g, bem como nenhuma das amostras apresentaram níveis detectáveis de toxina estafilocócica (BRASIL, 2022).

Todas as amostras de queijo colonial artesanal avaliadas são considerados de umidade média, visto que seus teores de umidade variam de 36% a 46%. Assim, os limites e critérios de aceitação baseiam-se tanto na IN 161/22 quanto na Portaria MAPA 146/96.

Tabela 3. Resultado das análises microbiológicas para queijo Colonial artesanal.

Análises	Amostras*				
	RGD7	RGD21	RG1	RG7	RP15
<b>Mesófilos Aeróbios (logUFC/g)</b>	7,82 ± 0,45	7,87 ± 0,13	7,67 ± 0,03	8,17 ± 0,18	8,31 ± 0,08
<b>Bolores e Leveduras (logUFC/g)</b>	6,24 ± 0,05	4,84 ± 0,02	4,56 ± 0,02	3,42 ± 0,11	4,65 ± 0,02
<b>Bactérias Ácido Lácticas (logUFC/g)</b>	7,93 ± 0,16	7,86 ± 0,04	7,40 ± 0,13	8,18 ± 0,10	8,16 ± 0,23
<b>Enterobacteriaceae (logUFC/g)</b>	4,81 ± 0,05	3,93 ± 0,00	6,59 ± 0,06	6,02 ± 0,03	< 1 ± 0,00
<b>Escherichia coli (logUFC/g)</b>	3,68 ± 0,13	<1 ± 0,00	4,48 ± 0,04	3,75 ± 0,07	1,63 ± 0,21
<b>Estafilococos coagulase positiva (logUFC/g)</b>	2,00 ± 0,00	2,17 ± 0,24	< 1 ± 0,00	1,82 ± 0,00	2,13 ± 0,00
<b>Salmonella spp. (25g)</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Listeria monocytogenes (25g)</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Toxina Estafilocócica</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

\*RGD7 = maturado por 7 dias, ano 2022; RGD21 = 21 dias de maturação, ano de 2022; RG1 = 1 dia de maturação, ano 2023; RG7 = 7 dias de maturação, ano 2023; RP15 = 15 dias de maturação, ano de 2023.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

O resultado das análises para mesófilos apresentaram um valor superior a 6 log UFC/g para ambos os queijos e, apesar de a legislação brasileira não fornecer

limites para este grupo de microrganismo, os valores significativos podem ser considerados um indicativo de elevada contaminação microbiológica, capaz de afetar a qualidade dos queijos. Em geral, quanto maior a contagem de mesófilos, principal contaminante do leite, menor o prazo de validade do queijo visto que este tipo de contaminação favorece a deterioração do produto (RIBAS; DARROIT, 2022; GARCIA *et al.*, 2017; ROSS *et al.*, 2005).

Para bolores e leveduras, apesar de a legislação não fornecer valores limite para estes microrganismos baseado em queijos de umidade média, aqueles que o teor de umidade varia de 36 a 46%, toma-se por base os valores fornecidos pela Portaria MAPA 146/96 para queijos de alta umidade ( maior que 55%). Este sugere como critério de aceitação 3,7 log UFC/g, desta forma, somente a amostra RG7 (2023) atende aos requisitos. A presença e abundancia de bolores e leveduras, tanto na superfície do queijos quanto em sua composição, pode contribuir significativamente para as qualidades sensoriais desejáveis do produto (MARTIN; COTTER, 2023). Por outro lado, a presença destes microrganismos em grande quantidade pode ser indesejável, visto que sua ação deteriorante resulta em alterações de sabor, odor, cor e textura do produto (RIBAS; DARROIT, 2022). Além disso, alguns gêneros de bolores são capazes de produzir micotoxinas, metabólitos tóxicos secundários.

BALs são o principal grupo bacteriano presente em queijos, a alta contagem presente nas amostras, acima de 7,4 log UFC/g, pode ser considerado benéfico ao produto, sendo responsáveis pela formação de compostos relacionados a sabor e aroma. O processo fermentativo das BALs, em geral, resulta em ácido lático como principal produto da fermentação, fazendo com que o produto acidifique alterando o pH, inibindo outros microrganismos indesejáveis e potencialmente patogênicos (FREIRE *et al.*, 2021).

A contagem de *Enterobacteriaceae* diminuiu conforme o tempo de maturação, fenômeno observado em ambos os anos analisados. De acordo com a Portaria nº 146 de 1996, o limite máximo tolerável para coliformes totais é estabelecido em 3,7 log UFC/g. Portanto, dentre os queijos analisados, a amostra RP15 (2023) é a mais próxima do limite recomendado. Ademais, os limites impostos para *E. coli* em queijos com umidade inferior a 46%, segundo a IN 161/2022, é de 2 log UFC/g, fazendo com que somente as amostras com maior tempo de maturação, RGD21 (2022) e RP15 (2023), estejam de acordo com a legislação vigente. Conforme mencionado anteriormente, a recuperação e contagem de *E. coli* é comumente utilizada como

microrganismos indicador, evidenciando aspectos higiênico-sanitários do ambiente de produção (ALTALHI; HASSAN, 2009).

## **5.2 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *E. coli***

A seleção de potenciais cepas resistentes serviu de triagem inicial e cerca de 75,7% das cepas submetidas ao processo resistiram à concentração do antibiótico testado e seguiram para o TSA. Para a avaliação do perfil de resistência das cepas utilizou-se o método de Kirby-Bauer. Os pontos de corte adotados foram os descritos pelo BrCast (2023), na ausência de informações adotou-se as fornecidas pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e/ou ECOFF (valor de corte epidemiológico).

Ao todo, foram testados 53 isolados de *E. coli*. Destas, 20 isolados provenientes de duas amostras do ano de 2022 e 33 isolados do ano de 2023 obtidos a partir de três amostras. Cerca de 17,00% (9 cepas), foram totalmente susceptíveis aos antimicrobianos testados. As cepas isoladas da amostra RP15 (2023) apresentou a maior susceptibilidade, cerca de 40,00% (2/5) das cepas testadas foram totalmente sensíveis aos 16 antibióticos testados. Seguido pelas cepas isoladas da amostra RGD7 (2022) com cerca de 36,4% (4/11) de suas cepas consideradas totalmente sensíveis. Os isolados do queijo RGD21 (2022) apresentou 22,22% (2/9) de susceptibilidade. As cepas isoladas da amostra RG1 apresentou a menor susceptibilidade dentre as amostras, apenas 5,55% (1/18), foram totalmente sensíveis. O perfil de resistência das cepas isoladas está apresentado na Tabela 4 e figura 5.

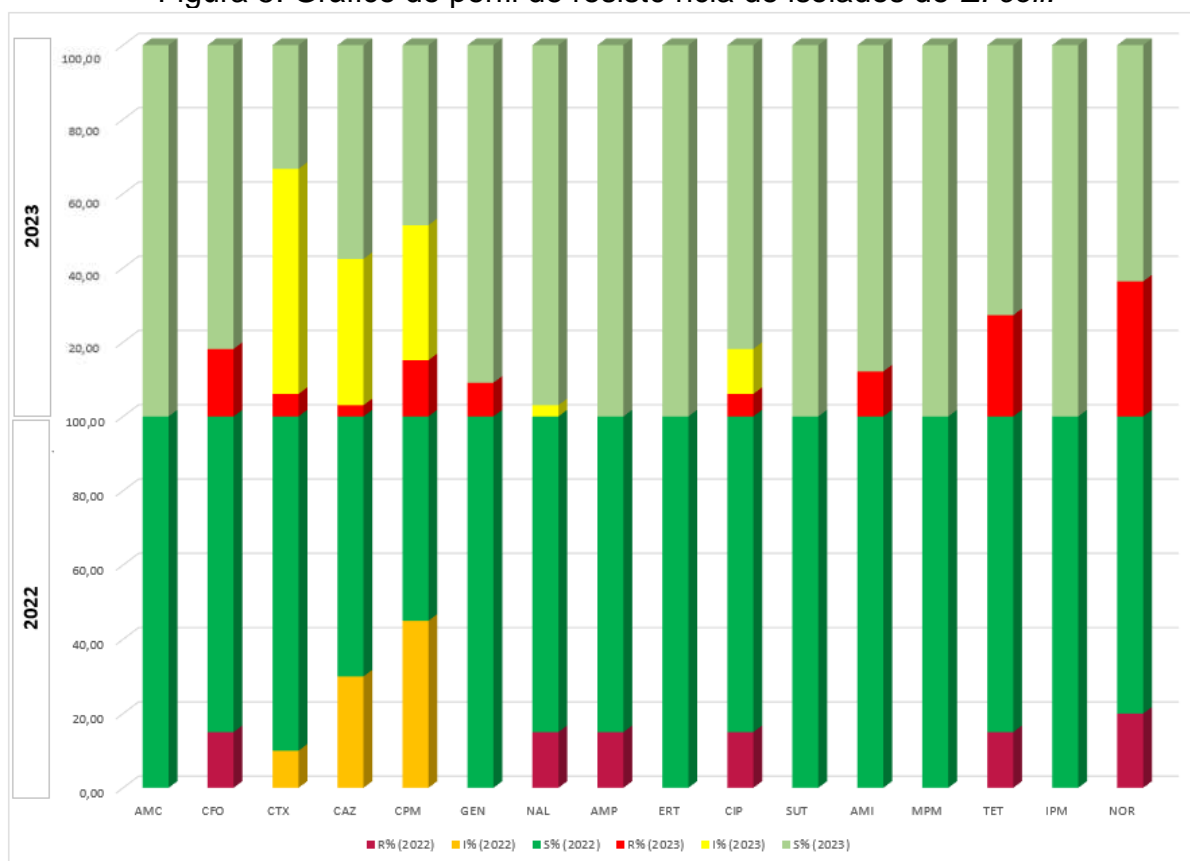
Tabela 4. Perfil de resistência das cepas isoladas a partir de amostras de queijo colonial artesanal

Antibióticos**	2022			2023		
	R(%)*	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)
AMC	-	-	100,00	-	-	100,00
CFO	15,00	-	85,00	18,18	-	81,82
CTX	-	10,00	90,00	6,06	60,61	33,33
CAZ	-	30,00	70,00	3,03	39,39	57,58
CPM	-	45,00	55,00	15,15	36,36	48,48
GEN	-	-	100,00	9,09	-	90,91
NAL	15,00	-	85,00	-	3,03	96,97
AMP	15,00	-	85,00	-	-	100,00
ERT	-	-	100,00	-	-	100,00
CIP	15,00	-	85,00	6,06	12,12	81,82
SUT	-	-	100,00	-	-	100,00
AMI	-	-	100,00	12,12	-	87,88
MPM	-	-	100,00	-	-	100,00
TET	15,00	-	85,00	27,27	-	72,73
IPM	-	-	100,00	-	-	100,00
NOR	20,00	-	80,00	36,36	-	63,64

\*R = Resistência; I = Resistência Intermediária; S = Susceptibilidade.

\*\*AMC = amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), CAZ = ceftadizima (30µg), CTX = cefotaxima (30µg), CPM = cefepime (30µg), CFO = cefoxitina (30µg), AMP = ampicilina (10µg), TET = tetraciclina (30µg), GEN = gentamicina (10µg), CIP = ciprofloxacina (5µg), NAL = ácido nalidíxico (30µg), AMI = amicacina (30µg), SUT = sulfametoxazol-trimetoprim (25µg), NOR = norfloxacina (10µg), ERT = ertapenem (10µg), IPM = imipenem (10µg) e MPM = meropenem (10µg).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 5. Gráfico do perfil de resistência de isolados de *E. coli*.

\*R% = percentual de resistência; I% = percentual de resistência intermediária; S% = percentual de susceptibilidade.

\*\*AMC = amoxicilina-ácido clavulânico (30 $\mu$ g), CAZ = ceftadizima (30 $\mu$ g), CTX = cefotaxima (30 $\mu$ g), CPM = cefepime (30 $\mu$ g), CFO = cefoxitina (30 $\mu$ g), AMP = ampicilina (10 $\mu$ g), TET = tetraciclina (30 $\mu$ g), GEN = gentamicina (10 $\mu$ g), CIP = ciprofloxacina (5 $\mu$ g), NAL = ácido nalidíxico (30 $\mu$ g), AMI = amicacina (30 $\mu$ g), SUT = sulfametoxazol-trimetoprim (25 $\mu$ g), NOR = norfloxacina (10 $\mu$ g), ERT = ertapenem (10 $\mu$ g), IPM = imipenem (10 $\mu$ g) e MPM = meropenem (10 $\mu$ g).

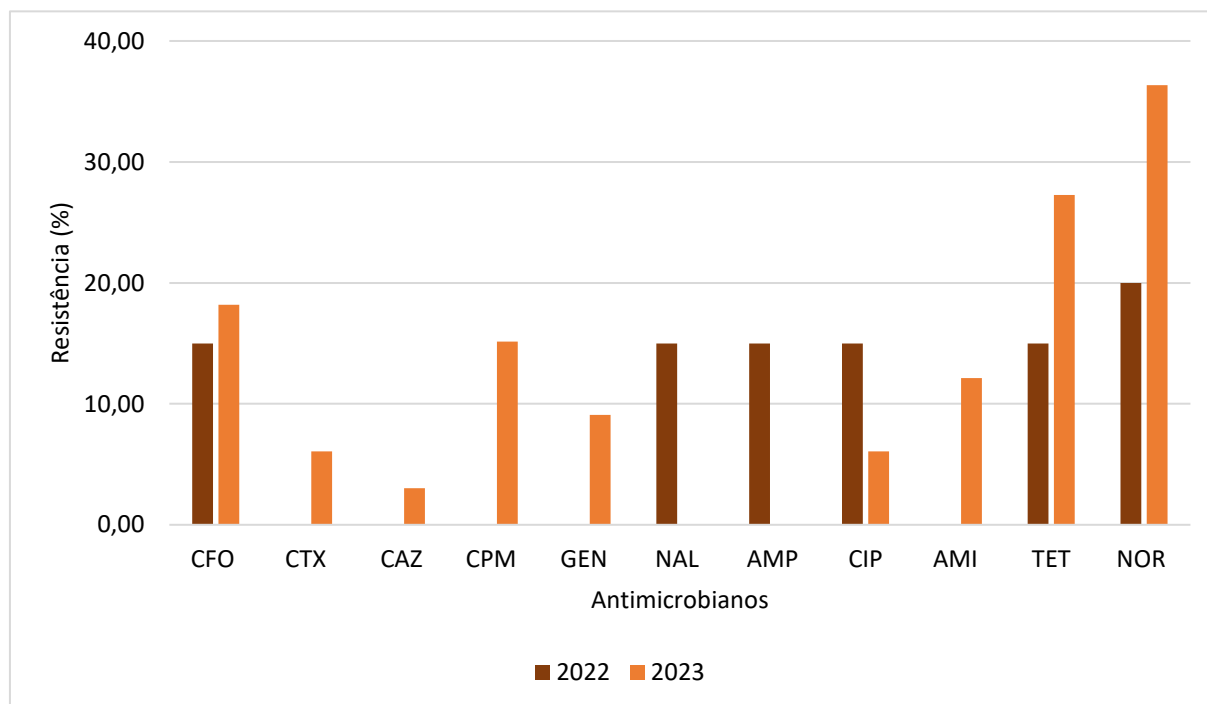
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Todos os isolados foram 100% susceptíveis a AMC, ERT, SUT, MPM e IPM, além disso, as cepas provenientes de amostras de 2022 também apresentaram susceptibilidade a AMI e GEN enquanto as de 2023 foram susceptíveis a AMP, esta evolução no perfil de resistência das cepas está apresentada na Figura 6.

A projeção estimada é que a susceptibilidade a um determinado antimicrobiano diminua ao longo do tempo, o contrário do que ocorreu com a AMP e NAL, que apresentaram certa resistência em 2022 e susceptibilidade em 2023 (Figura 5). Esses dados podem ser um indicativo de uma alteração no perfil do gado leiteiro utilizado na produção dos queijos (POIREL *et al.*, 2018). A troca de animais, bem como mudanças no fluxo de produção e condições higiênico-sanitárias, estão relacionadas

não somente à microbiota do queijo, mas também ao perfil de resistência (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Figura 6. Evolução do perfil de resistência das amostras entre os anos de 2022 e 2023



\*CAZ = ceftadizima (30 $\mu$ g), CTX = cefotaxima (30 $\mu$ g), CPM = cefepime (30 $\mu$ g), CFO = cefoxitina (30 $\mu$ g), AMP = ampicilina (10 $\mu$ g), TET = tetraciclina (30 $\mu$ g), GEN = gentamicina (10 $\mu$ g), CIP = ciprofloxacina (5 $\mu$ g), AMI = amicacina (30 $\mu$ g), NOR = norfloxacina (10 $\mu$ g).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

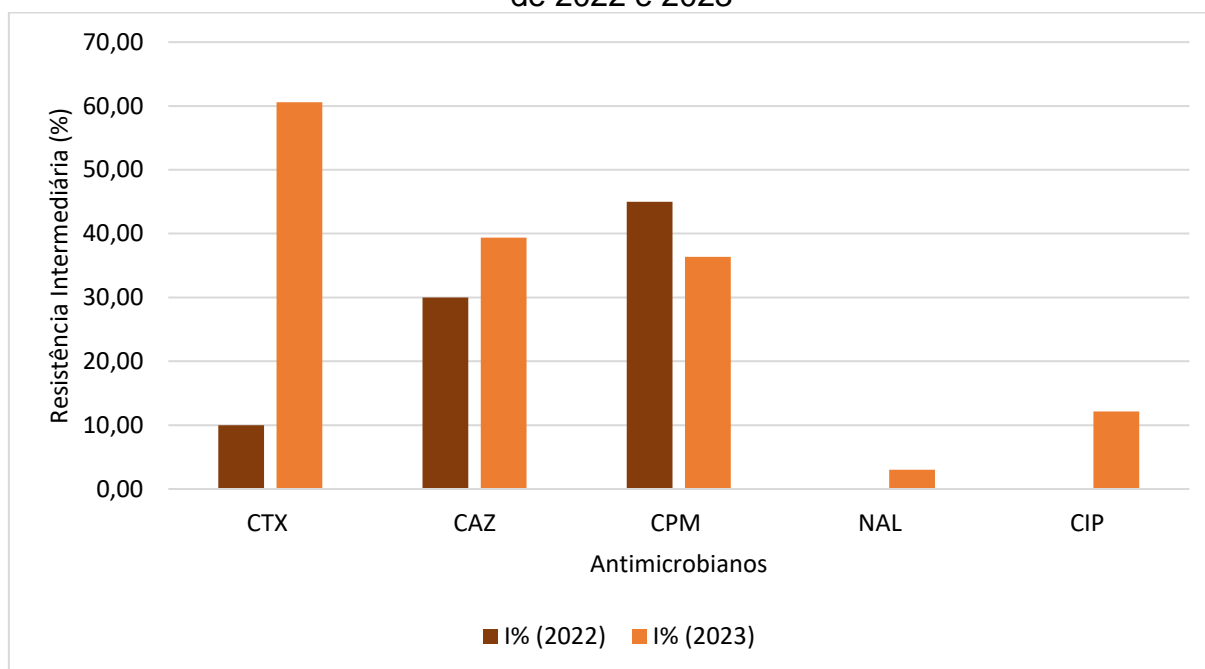
A maior resistência foi apresentada ao NOR, 20% nos isolados de 2022 e cerca de 36,4% para os isolados de 2023, seguidos pela TET (15,0% e 27,3%), CFO (15,0% e 18,2%), respectivamente, conforme ilustrado na Figura 6. Os principais genes de resistência às quinolonas, neste estudo representado pelas fluoroquinolonas NOR, CIP e NAL, estão relacionados com os genes *qnr*, sendo o mecanismo mais comum mediado por plasmídeo (PIRES *et al.*, 2019). Tetraciclinas são amplamente utilizadas na medicina veterinária, contudo, devido ao uso generalizado diversas bactérias desenvolveram resistência (POIREL *et al.*, 2018). Dentre os nove genes de efluxo de tetraciclina, os genes mais comuns associados à resistência são *tetA*, *tetB* e *tetC* sendo *tetA* e *tetB* os genes de maior prevalência em *E. coli* resistente de origem animal (POIREL *et al.*, 2018).



Além disso, as cepas de *E. coli* testadas exibiram diferentes níveis de resistência a cefalosporinas, a saber, CTX (6,06% em isolados de 2023) , CPM (15,15% em isolados de 2023), CAZ (3,03% em isolados de 2023) e CFO (15,00% em isolados de 2023 e 18,18% em isolados de 2023). Portanto, vale ressaltar que esses resultados constituem uma grande preocupação para a saúde pública, pois as cefalosporinas (3ª e 4ª gerações) são amplamente utilizadas no manejo de infecções humanas na atualidade (IMRE *et al.*, 2022). Geralmente, os genes associados à resistência de cefalosporinas são os genes ESBL *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-14, *bla*TEM e *bla*SHV-12 juntamente com uma ampla gama de outros variantes de genes *bla*CTX, TEM e SHV (POIREL *et al.*, 2018).

Alguns isolados também apresentaram resistência intermediária a alguns antimicrobianos, conforme representado na Tabela 4 e Figura 5. A resistência intermediria ocorre quando é apresentada uma resposta parcial à ação de um determinado antimicrobiano, ou seja, o medicamento tem um efeito limitado sobre o microrganismo (SALMAN *et al.*, 2017). Essa condição, além de dificultar a abordagem terapêutica, pode ainda contribuir na aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal (POIREL *et al.*, 2018). O perfil de resistência intermediária dos isolados analisados em dois anos, estão descritos na Figura 7.

Figura 7. Evolução do perfil de resistência intermediária das amostras entre os anos de 2022 e 2023



\*CAZ = ceftadizima (30 $\mu$ g), CTX = cefotaxima (30 $\mu$ g), CPM = cefepime (30 $\mu$ g), NAL = ácido nalidíxico (30 $\mu$ g), CIP = ciprofloxacina (5 $\mu$ g).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Apesar da resistência intermediária a cefalosporinas apresentada na Figura 7, não houve a formação de halo fantasma na investigação de cepas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), característica típica deste tipo de cepa. Esta investigação foi realizada visto que, uma vez resistente aos beta-lactâmicos, as cepas de *E. coli* tornam-se um verdadeiro desafio (POIREL *et al.*, 2018; PARUSSOLO *et al.*, 2019). Tradicionalmente, isolados produtores de ESBL, principalmente portadores do gene *bla*TEM e *bla*SHV, exibem coresistência a aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfonamidas (JUMA *et al.*, 2017). Além disso, na década de 80, as ESBLs do tipo SHV e TEM, destacaram-se como principal causa de resistência à cefalosporina entre as *Enterobacteriaceae* (PIRES *et al.*, 2019).

Na tentativa de proporcionar uma terapia antimicrobiana eficaz, os carbapenêmicos têm sido uma das opções mais agressivas para tratar as infecções humanas e veterinárias, incluindo as causadas por bactérias produtoras de ESBL (PARUSSOLO *et al.*, 2018). Quando resistentes, realmente necessitam de abordagens mais agressivas que, se não realizadas de acordo com protocolo estabelecido, podem contribuir para a multirresistência do microrganismo e suas patologias (ALVES *et al.*, 2016).

Cerca de 15,0% dos isolados de amostras de 2022 e 12,1% de 2023, apresentaram um perfil de multirresistência, ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Resultado este que corrobora com estudos já realizados na região (PARUSSOLO *et al.*, 2018), semelhantes também a estudos realizados em outros países. Ombarak *et al.* (2018) relataram taxas de multirresistência inferiores a 20% em isolados de *E. coli* obtidos de leite cru e queijos produzidos a partir de leite cru no Egito. Liu *et al.* (2021) investigaram perfil de resistência de cepas isoladas a partir de leite cru na região norte da China, o qual apresentou cerca de 19,4% de cepas multirresistentes.

Alguns estudos apontam *E. coli* como a principal enterobactéria causadora de infecções do trato urinário (BARBOSA *et al.*, 2022). Alves *et al.* (2016) descreveu essa infecção como o 14º motivo para consultas nas unidades básicas de saúde do município de Florianópolis (SC), ficando atrás, entre as causas infecciosas, apenas da infecção aguda do aparelho respiratório superior e de gastroenterites. Até meados da segunda década dos anos 2000, era considerado a segunda causa mais comum de indicação de tratamento antimicrobiano na atenção primária no Brasil (COUPAT *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2016).

De acordo com o Boletim Epidemiológico (2021), elaborado pelo Ministério da Saúde, entre 2007 e 2019, foram notificados 9.030 surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). Dos 9.030 casos, apenas 36,27% tiveram a identificação do agente etiológico envolvido, sendo *E. coli* o segundo microrganismo com maior incidência de casos, cerca de 23,5%, ficando atrás apenas da *Salmonella* spp. (24,8%) (BRASIL, 2021). As regiões Sudeste e Sul notificaram o maior número de surtos, 39,0% e 29,7% respectivamente, no período de 2003 a 2018 (BRASIL, 2019).

Entre 2009 e 2019, ocorreram 1.795 internações por Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU), conforme dados fornecidos pelo Sistema de Informações Hospitalares, e cerca de 565 óbitos, conforme Sistema de Informação sobre Mortalidade (BRASIL, 2021). A SHU infecciosa de maior relevância epidemiológica são as causadas por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) contudo podem estar associadas a outros microrganismos (BRASIL 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de mortes causadas por cepas bacterianas resistentes a medicamentos pode crescer para 10 milhões por ano até 2050. Além disso, cada vez mais doenças comuns seriam

intransponíveis devido a bactérias multirresistentes que não respondem a terapia clínica convencional (WHO, 2022).

A evidência de genes potencialmente virulentos em algumas cepas de *E. coli* e expressivas taxas de multirresistência representam uma questão importante visto que os queijos e outros subprodutos lácteos podem ser veículos de transmissão de bactérias patogênicas (OMBARAK *et al.*, 2018; IMRE *et al.*, 2022). O perfil de susceptibilidade varia de acordo com cada região, por isso o monitoramento periódico torna-se fator essencial para obtenção de informações atualizadas que reflitam a peculiaridade regional (BARBOSA *et al.*, 2022). Assim é possível uma orientação mais assertiva quanto às terapias antimicrobianas utilizadas, evitando o uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto para humanos quanto em animais (POIREL *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2019).

De modo geral, apesar de bactérias resistentes serem encontradas em produtos crus, não são necessariamente um indicativo de risco à saúde do consumidor. Contudo, podem cooperar para a disseminação de resistência à antibióticos no meio ambiente contribuindo para uma transferência de genes de resistência (KRAHULCOVÁ *et al.*, 2022).

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a qualidade microbiológica e o perfil de resistência microbiana de cepas de *E. coli* isoladas de queijo colonial artesanal, produzido na região oeste de Santa Catarina. A contaminação expressiva de bactérias mesófilas aeróbicas e bolores e leveduras foi observada em todos os queijos. Este é um indicador importante que sugere que as práticas higiênico-sanitárias adotadas estão sendo insuficientes e podem ser relacionadas à qualidade do leite, manuseio e equipamentos.

Ao todo, foram avaliados 53 isolados de *E. coli*, sendo 20 isolados provenientes de amostras coletas em 2022 e 33 de amostras coletadas no início do ano de 2023. Quanto ao perfil de resistência dos isolados, cerca de 17,00% dos isolados foram totalmente susceptíveis aos 16 antibióticos testados.

Dada a importância cultural e econômica do queijo colonial artesanal, é de grande relevância ações que estimulem a capacitação dos queijeiros quanto à implementação de medidas higiênico-sanitárias a fim de resultar em uma melhoria da qualidade microbiológica e, por conseguinte, mais segurança dos produtos artesanais produzidos a partir de leite cru.

Sugere-se para trabalhos futuros, isolar *E. coli* de outros queijos coloniais artesanais produzidos na região, bem como realizar um estudo e avaliação dos genes de resistência das cepas por meio de PCR, a fim de conhecer melhor os genes de resistência que estão circulando na região. Além disso, será possível uma orientação assertiva quanto às terapias antimicrobianas utilizadas, tanto em humanos quanto em animais da região.

## REFERÊNCIAS

- ADELOU, M., *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Int. J Syst Evol Microbiol.**, v. 66(12), pp. 5575-5599, 2016.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, v. 20, p. 913-917, 2009.
- ALVES, D. M. dos S. Infecções comunitárias do trato urinário: prevalência e susceptibilidade aos antimicrobianos na cidade de Florianópolis. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 11(38), pp. 1-12, 2016.
- AMOS G. C. A. *et al.* The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. **The ISME Journal**, v. 12, pp. 681-691, 2018.
- ANDRADE, B. M., *et al.* Chemometric classification of Brazilian artisanal cheeses from different regions according to major and trace elements by ICP-OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, 2022.
- ARAGÃO, B. B., *et al.* Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 84, 2022.
- ARAÚJO, J. P. A., *et al.* A critical-historical analysis of the continuous development of Brazilian legislation related to artisanal cheeses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 72, n. 5, pp. 1845-1860, 2020.
- BADARÓ, A. C. L., *et al.* Microbiota do queijo colonial artesanal produzido pela agricultura familiar em diferentes condições de maturação. In: 7 Simpósio de Segurança Alimentar, 2020, Bento Gonçalves - RS. **Anais do 7 Simpósio de Segurança Alimentar**, 2020.
- BABOSA, E. de S., *et al.* Prevalence and resistance profile of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e0611124280, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.24280. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24280>. Acesso em: 1 may. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 6 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 6 de jul. 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à Saúde. **Módulo 6: Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica**. Brasília: Anvisa, 2013a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 10: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Brasília: Anvisa, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10<sup>a</sup> da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 de jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, Página 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Selos de Identificação Artesanal**. Publicado em 25 de jul. 2019 e atualizado em 12 de set. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/selo-arte>. Acesso em: 19 de dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013. Estabelece critérios adicionais para elaboração de Queijos Artesanais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 nov. 2013. Seção 1, p. 19.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**: Doenças tropicais negligenciadas, número especial, mar., 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tracoma/publicacoes/boletim-epidemiologico-doencas-tropicais-negligenciadas>. Acesso: 12 de jun. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**: Vigilância em Saúde no Brasil 2003 | 2009, número especial, set., 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 12 de jun. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: **Ministério da Saúde**, Manuais Técnicos, ed. 1, série A, pp. 10-210, 2008.

BrCAST. Teste sensibilidade aos antimicrobianos. **Método disco-difusão EUCAST 2021**. Disponível em: [www.brcast.org.br/](http://www.brcast.org.br/). Acesso em: 10 de dez. 2022.

BrCAST. **Tabelas de pontos de corte e interpretação de CIMs e diâmetro de halos 2022**. Disponível em: <https://brcast.org.br/>. Acesso em: 10 de dez. 2022.

BrCAST. **Tabelas de pontos de corte e interpretação de CIMs e diâmetro de halos 2023**. Disponível em: <https://brcast.org.br/>. Acesso em: 16 de mar. 2023.

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

CARVALHO, M. M., *et al.*, Tradicional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102(11), pp. 9711-9720, nov. 2019.

CARVALHO, M. M.; LINDNER, J. D.; FARINÃ, L. O. A produção de queijo colonial artesanal no município de Seara, estado de Santa Catarina, frente à legislação brasileira. **Ver. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 5, p. 253-261, nov. 2016.

CHAUHAN, A. T., *et al.* Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal of Dairy Science**, v. 99(8), pp. 6105-6120, 2016.

CLEMENTS, A., *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microb.**, v. 3, pp. 71-87, 2012.

COUPAT, C., *et al.* Selective reporting of antibiotic susceptibility data improves the appropriateness of intended antibiotic prescriptions in urinary tract infections: a case-vignette randomised study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32(5), pp. 627-636, 2013.

CRECENCIO, R. B. **Caracterização genotípica de patogenicidade e resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de carne de frango**. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Santa Catarina, Chapecó, p. 61, 2018.

CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. Tradition and diversity jeopardized by food safety regulations? The Serrano Cheese case, Campos de Cima da Serra region, Brazil. **Food Pol.**, v. 45, pp. 116-124, 2014.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus spp.*: General Characteristics. **J. W. Fuquay (Ed), Encyclopedia of Dairy Sciences**, Second Edition, Academic Press, pp. 78-89, 2011.

DE FERNANDO, G. G. Lactic Acid Bacteria | *Enterococcus* in Milk and Dairy Products. **J. W. Fuquay (Ed), Encyclopedia of Dairy Sciences**, Second Edition, Academic Press, pp. 153-159, 2011.

DE FILIPPIS, F., *et al.* Past, present and future of the food microbiome. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 9, pp. 589-608, 2018.

FERREIRA, A. A., *et al.* Tracking Amazonian cheese microbial diversity: Development of an original, sustainable, and robust starter by freeze drying/spray drying. **J. Dairy Sci.**, v. 100, pp. 6997-7006, 2017.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.



FOX, P. F., *et al.* Starter cultures. **Fundamentals of Cheese Science**, Aspen Publishers, Gaithersburg (2000), pp. 54-97.

FRAQUEZA, M. J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermentation sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 212, pp. 76 – 88, 2015.

FREIRE, T., *et al.* Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, 2021.

FUNCK, G. D. *et al.* Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 74, pp. 247-257, 2015.

GARCIA, E. P., *et al.* Qualidade microbiológica de queijos Minas frescal e ricota comercializados na região metropolitana de Campinas, SP. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, pp. 132-137, 2017.

GUERIN, E. *et al.* The SOS response controls integron recombination. **Science**, v. 324, n. 5930, pp. 1034, 2009.

HASSAN, A. N. ; FRANK, J. F. Microorganisms Associated With Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (Second Edition), Academic Press, pp. 447-457, 2011.

HOSSAIN, Z. Bacteria: *Streptococcus*. **Encyclopedia of Food Safety**, Academic Press, pp. 535-545, 2014.

IBRAHIM, Salam A. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus spp.*: Other Species. **Reference Module in Food Science**, 2016.

IBRAHIM, A. H. M. *et al.* Prevalence and Characterization of *Escherichia coli* in Raw Milk and Some Dairy Products at Mansoura City. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 12 (4), pp. 363-370, 2022.

IMRE, K., *et al.* Occurrence, Pathogenic Potential and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk Cheese Commercialized in Banat Region, Romania. **Antibiotics**, v. 11(6), 2022.

ISSA, Aseel T.; TAHERGORABI, Reza. Chapter 22 - Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. **Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases**, Academic Press, pp. 265-275, 2019.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO/TC 16649-2: 2022**: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO; 20022. 8 p.

JANDA, J. M; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clin. Microbiol Rev.**, v. 34(2), 2021. doi: 10.1128/CMR.00174-20.

JONHSON, M. E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 100(12), pp. 9952-9965, 2017.

KAMIMURA, B. A., *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 18, n. 5, pp. 1636-1657, 2019a.

KAMIMURA, B. A., *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, pp. 40-49, 2019b.

KRAHULCOVÁ, M., *et al.* Characterization of Antibiotic Resistant Coliform Bacteria and Resistance Genes Isolated from Samples of Smoothie Drinks and Raw Milk. **Foods**, v. 11(9), 2022.

LIU, H., *et al.* Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated From Raw Milk in Dairy Herds in Northern China. **Front Microbiol**, v. 12, 2021.

MADANI, A., *et al.* Evaluation of Virulence Factors, Antibiotic Resistance, and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Isolated from Milk and Dairy Products in Isfahan, Iran. **Foods**, v. 11(7), 2022.

MARGALHO, L. P., *et al.* Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties – Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103(9), pp. 7908-7926, sep. 2020.

MARTIN, J. G. P.; COTTER, P. D. Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity?. **Heliyon**, v. 9 (4), 2023.

MARTINS, M. C. de F., *et al.* Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, pp. 295-300, 2018.

MEJIA, R. J., *et al.* Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Michoacan, Mexico. **Rev Mexicana Ciencias Pecuarias**, v. 8, pp. 387-396, 2017.

NIKOLOUDAKI, O., *et al.* Role prediction of Gram-negative species in the resistome of raw cow's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 340 (16), 2021.

OHMURA-HOSHINO, M., *et al.* A one-step multiplex PCR-based assay for simultaneous detection and classification of virulence factors to identify five diarrheagenic *E. coli* pathotypes. **Heliyon**, v. 8(8), 2022.

OLAJIDE, A. M.; LAPOINTE, G. Microorganisms Associated with Raw Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (Third Edition), Academic Press, pp. 319-328, 2022.

OLIVEIRA, N. A., *et al.* *Listeria monocytogenes* in Brazilian foods: Occurrence, risks to human health and their prevention. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 7 (2), PP. 320-330, 2019.

OMBARAK, R. A., *et al.* Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk and Raw Milk Cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81(2), pp. 226-232, 2018.

PARUSSOLO, L. *et al.* Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, 40(1), 163–178, 2019.

PASQUA, M., *et al.* The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2390, 2017.

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, pp. 160-169, 2017.

PINTO, M. S., *et al.* Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Contr.**, v. 20, pp. 1167-1170, 2009.

PIRES, B. A. D. *et al.* Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. **Vigilância Sanitária em Debates, INCQS – FIOCRUZ**, vol 7, núm. 3, pp. 86-91, 2019.

POIREL, L., *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6(4), 2018.

QUEIJO ARTESANAL DE LEITE CRU. **Slow Food Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://slowfoodbrasil.org.br/temas-campanhas/queijo-artesanal-de-leite-cru/>>. Acesso em: 02, abril de 2023.

RANGEL-ORTEGA, A. del C., *et al.* Biological control of pathogens in artisanal cheeses. **International Dairy Journal**, v. 140, 2023.

RESENDE, F., *et al.* Estudo avaliativo do perfil de resistência de micro-organismos com destaque aos micro-organismos patogênicos e aos antibióticos em leite e derivados. **R. bras. Tecnol. Agroindust.**, Francisco Beltrão, v. 15, n. 01, p. 3510-3533. 2021.

RIBAS, M. M.; DAROIT, D. J. Microbiological evaluation of colonial cheeses produced in Roque Gonzales, Northwest of Rio Grande do Sul state, Brazil. **J. Vet. Sc. Public Health**, v. 9, n. 1, pp. 83-94, 2022.

- RIBEIRO, L. F., *et al.* Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. on Brazilian Dairy Farms that Produce Unpasteurized Cheese. **Toxins**, v. 12, pp. 1-10, 2020.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* *Short communication*: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, issues 12, p. 10850-10854, 2019.
- ROLDAN, B. B.; REVILLION, J. P.P. Convenções de qualidade em queijos artesanais no Brasil, Espanha e Itália. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 74, n. 2, p. 108–122, 18 jun. 2019.
- ROSS, T. B., *et al.* Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 132, pp. 94-96, 2005.
- RUBIOLA, S., *et al.* Shotgun metagenomic sequencing of bulk tank milk filters reveals the role of Moraxellaceae and Enterobacteriaceae as carriers of antimicrobial resistance genes. **Food Research International**, v. 158, 2022.
- SALMAN, A., *et al.* Detection of antibiotic resistant *Escherichia Coli* bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. **Analyst**, v. 142 (12), pp. 2136-2144, 2017
- SANTA CATARINA. **LEI Nº 18.250, de 10 de novembro de 2021**. Dispõe sobre os requisitos exigidos para elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru. Florianópolis: Assembleia Legislativa, 2021.
- SANTOS, L. S., *et al.* Easy classification of tradicional Minas cheeses using artificial neural networks and discriminant analysis. **Int. Journal Dairy Technol.**, v. 70, pp. 1 – 7, 2017.
- SHANI, A., *et al.* Evaluation of a new culture medium for the enumeration and isolation of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* from cheese. **Food Microbiology**, v. 95, 2021.
- SHIN, S. W. *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* Isolates from beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 5560-5566, 2015.
- SILVA, S. P. M., *et al.*, Application of an alginate-based edible coating with bacteriocin-producing *Lactococcus* strains in fresh cheese preservation. **LWT**, v. 153, 2020.
- SRINIVASAN, V., *et al.* Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Vet Microbiol**, v. 124, pp. 319-328, 2007.

SUOJALA, L.; KARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. **J Vet Pharmacol Ther.**, v. 36(6), pp. 521-531, 2013.

TADJINE, D., *et al.* Milk heat treatment affects microbial characteristics of cows' and goats' "Jben" traditional fresh cheeses. **Food Science and Technology**, v. 41(1), pp. 136-143, 2021.

TABAN, B. M., *et al.* Microflora of the Intestine | Biology of the *Enterococcus* spp. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Academic Press, ed. 2, pp. 652-657, 2014.

TEMAKI, Y. *et al.* A relação entre antígenos O e genes patogênicos de *Escherichia coli* associada à diarreia. **Jpn. J. Infectar. Des**, v. 58, p. 65-69, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 12<sup>o</sup> ed traduzida. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WANG, J. *et al.* Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, pp. 94-101, 2020.

WHO, World Health Organization. (2017) **Antimicrobial Resistance fact sheets- What is antimicrobial resistance?** [internet]. [Florianópolis]: WHO. [acesso em 2022, set 29]. <Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/75/en/>>

WHO, World Health Organization. (2022) **New Report Calls for Urgent Action to Avert Antimicrobial Resistance Crisis. Available online:** [internet]. [Florianópolis]: WHO. [acesso em 2023, jun 15]. <Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>>

YAGOOB M. *et al.* Occurrence and transmission of class 1 and 2 integrons among phenotypic highly ampicillin-resistant avian *Escherichia coli* isolates from Pakistan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, pp. 2041-2050, 2011.

ZARZECKA, U.; ZADERNOWSKA, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W. Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. **LWT**, v. 127, 2020.

ZHANG, H. Z. *et al.* A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. **Science**, v. 291, pp. 1962-1965, 2001.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, issue 4, 2020.