

FERNANDA DANIELLE MELO

**POTENCIAL DE VIRULÊNCIA RELACIONANDO A PRESENÇA DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS, GENES DE ENTEROTOXINAS E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Staphylococcus* sp. ISOLADOS DO LEITE E QUEIJO
ARTESANAL SERRANO**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção parcial do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Sandra M. Ferraz

**LAGES, SC
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC**

Melo, Fernanda Danielle
POTENCIAL DE VIRULÊNCIA RELACIONANDO A PRESENÇA
DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, GENES DE
ENTEROTOXINAS E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE
Staphylococcus sp. ISOLADOS DO LEITE E QUEIJO
ARTESANAL SERRANO / Fernanda Danielle Melo. - Lages
, 2018.
73 p.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz
Co-orientador: Ubirajara Maciel da Costa
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação --
Selecione --, Lages, 2018.

1. Staphylococcus spp.. 2. Enterotoxinas. 3.
Biofilme. 4. Resistência. I. Ferraz, Sandra Maria.
II. da Costa, Ubirajara Maciel. , .III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
-- Selecione --. IV. Título.

FERNANDA DANIELLE MELO

**POTENCIAL DE VIRULÊNCIA RELACIONANDO A PRESENÇA DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS, GENES DE ENTEROTOXINAS E FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Staphylococcus* sp. ISOLADOS DO LEITE E QUEIJO
ARTESANAL SERRANO**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca examinadora:

Orientador:

Dra. Sandra Maria Ferraz
UDESC/Lages

Coorientador:

Dr. Ubirajara da Costa Maciel
UDESC/Lages

Membros:

Dr. Álvaro Menin
UFSC/Curitibanos

Dr. Diógenes Dezen
IFC/Concórdia

Dr. André Thaler Neto
UDESC/Lages

Dra. Lúcia H. Baggio Martins
IFSC/Lages

Lages, 26 de Fevereiro de 2018

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria, uma guerreira irrefutável, por sempre acreditar, me incentivar a crescer e a vencer. A sua vitória é a minha vitória, assim como a minha vitória é a sua vitória!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pela oportunidade da vida, por ser meu alento nos dias difíceis. Alegria nas minhas vitórias, esperança e fé na minha caminhada.

Aos meus pais João e Maria, por todo apoio e amor incondicionais, por acreditarem em mim sempre.

A minha irmã Renata, por me apoiar nesta caminhada, pelas brigas (hehe) e também pelos cafunés.

Ao meu irmão Anderson e minha cunhada Camila, pelo maior presente que vocês nos deram a nossa pequena Gege. Agradeço a você minha amada afilhada (motivo de nossas alegrias), por trazer alegria e esperança para dentro de nossa casa e por ser a motivação da vovó.

Ao meu melhor amigo e namorado Juliano, por todo carinho e amor, pelo aprendizado constante, por ter sido meu companheiro e ficado ao meu lado nos dias que mais precisei, por me incentivar, motivar-me, apoiar-me e acreditar sempre.

A minha querida e amada tia Rose, por ter sido muitas vezes meu pilar, o meu suporte, jamais conseguirei retribuir por tudo que e faz pela minha mãe.

A minha amiga-irmã Alais, por mesmo distante ser tão presente em minha vida.

A professora Sandra, por acreditar em mim, pela sua orientação, amizade, confiança, compreensão e paciência em todas as fases deste trabalho.

A professora Eliana, pela confiança e carinho depositados a mim.

Ao professor Ubirajara, pela sua coorientação, confiança e amizade.

A professora Sheila, pela confiança e por todo aprendizado.

Ao professor Miletto, pela disponibilização do laboratório sempre que solicitado.

Aos demais professores do programa, pelos ensinamentos repassados.

Ao meu amigo-irmão Ricardo, foi Deus quem te colocou no meu caminho, pela amizade e infinda ajuda, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos amigos que fiz no Laboratório, Karine, Cláudia, Paula, Rosane, Evelin, Marta, Alice, Isabela, Myrian por todo auxílio e amizade, em especial ao bolsista do projeto Mateus, (foram tanto antibiogramas!!!).

Aos meus primos e demais familiares pelo apoio e risadas em nossos encontros. Em especial as minhas primas Heloisa, Cíntia, Deise e Isabelle pelo companheirismo e carinho mútuos.

As minhas amigas Lageanas, Franciele, Elaine, Caroline e Rosane, pelos momentos de lazer e boas risadas.

A UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina/ CAV, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional com a conclusão deste curso.

A UEM – Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilização do laboratório de microbiologia para execução de parte da pesquisa.

Agradeço a secretaria e demais funcionários da pós-graduação, pela solicitude sempre.

Agradeço também a CAPES e FAPESC pela concessão da bolsa durante esses 4 anos.

EPÍGRAFE

“O que enxergamos no outro, seja bom ou ruim, pode ser a leitura que fazemos de nós mesmo.”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Os estafilococos são frequentemente associados a surtos de intoxicações alimentares. Dentre os alimentos envolvidos nesses surtos encontram-se o leite e seus derivados, principalmente, queijos produzidos de forma artesanalmente e com leite cru. Este trabalho objetivou identificar os *Staphylococcus* coagulase positiva (CoPS), verificar o potencial enterotoxigênico através da pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), verificar a capacidade de produzir biofilme através do Ágar Vermelho Congo (CRA), identificar a ocorrência dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, caracterizar fenotípicamente o perfil de resistência à antimicrobianos e detectar molecularmente a presença de genes resistência aos fármacos beta-lactâmicos (*mecA* e *blaZ*) e dos genes *mecC* e *femA* em cepas de *Staphylococcus* sp. Para este estudo foram testadas 58 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e 46 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), totalizando 104 cepas bacterianas, isoladas do leite (33 isolados) e de seus respectivos queijos (71 isolados) artesanais serrano, produzidos na região serrana de Santa Catarina. A técnica de multiplex PCR foi utilizada para a pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *icaA*, *icaC*, *icaD*, *mecA*, *mecC*, *blaZ* e *femA*. A produção fenotípica de biofilme foi realizada pelo cultivo bacteriano em Ágar Vermelho Congo (CRA). Das 58 cepas de CoPS analisadas 64% foram identificadas fenotípica e genotípicamente como *S. aureus*. Oito cepas CoPS isoladas do leite apresentaram o gene *seb* e uma cepa oriunda do queijo foi positiva para o gene *sea*. Nenhum gene para as SEs foi detectado nas cepas de CoNS. Quanto ao potencial em formar biofilme das cepas CoPS, 53% (31/58) foram positivas para o gene *icaA* isoladamente, 5% (3/58) apresentaram somente o gene *icaD* e 27% (16/58) apresentaram ambos os genes *icaA* e *icaD*. Em relação aos CoNS 100% das amostras foram positivas para o gene *icaA* e 9% (4/46) apresentaram, simultaneamente, os genes *icaA* e *icaD*. Quanto ao teste do CRA, 64% (67/104) cepas de *Staphylococcus* spp. foram positivas e destas 7% (5/67) não apresentaram nenhum dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* testados. Para a detecção do perfil de resistência 103 cepas foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos, no qual observou-se maiores índices de resistência contra a PEN (41% CoPS) e (31% CoNS), AMO (40% CoPS), AMP (36% CoPS) e SUT (35% CoNS). Vinte e sete (26%) cepas (18 CoPS e 9 CoNS) demonstraram perfil de multirresistência, sendo resistentes a pelo menos três diferentes classes dos antimicrobianos testados. Observou-se ausência dos genes *mecC* em todas as cepas, 12 cepas (9 CoPS e 3 CoNS) foram positivas para *mecA* e 10 cepas (4 CoPS e CoNS) positivas para *blaZ*. A alta prevalência de *Staphylococcus aureus*, a presença de genes codificadores de enterotoxinas, genes formadores de biofilme e genes de resistência a antimicrobianos, bem como, a presença de cepas resistentes e multirresistentes evidenciam o potencial de virulência dos CoPS e CoNS, destacando a importância de serem seguidas rigorosamente as boas práticas de fabricação do alimento. Ademais, estes resultados destacam um risco para clínica veterinária e para a saúde pública, uma vez que, esses genes de resistência podem ser transferidos ao homem e/ou aos animais, dificultando ou até mesmo impossibilitando o tratamento de doenças potencialmente curáveis.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., enterotoxinas, biofilme, resistência.

ABSTRACT

Staphylococci are often associated with outbreaks of food poisoning. Among the foods involved in these outbreaks are milk and its derivatives, mainly, cheeses produced by handmade and with raw milk. This work aimed to identify Coagulase positive *Staphylococcus* (CoPS), to verify the enterotoxigenic potential by investigating the genes coding for staphylococcal enterotoxins (sea, seb, sec, sed and see), verify the ability to produce biofilm through Congo Red Agar (CRA), to identify the occurrence of *icaA*, *icaC* and *icaD* genes, phenotypically characterize the antimicrobial resistance profile and molecularly detect the presence of resistance genes to beta-lactam drugs (*mecA* and *blaZ*) and the *mecC* and *femA* genes in strains of *Staphylococcus* spp. For this study, 58 strains of *Staphylococcus* coagulase positive and 46 strains of *Staphylococcus* coagulase negative (CoNS) were tested, totalizing 104 bacterial strains, isolated from milk (33 isolates) and their respective handmade serrano cheeses (71 isolates), produced in the mountain region of Santa Catarina Santa. The multiplex PCR technique was used for the search of the genes sea, seb, sec, sed, see, *icaA*, *icaC*, *icaD*, *mecA*, *mecC*, *blaZ* and *femA*. Phenotypic biofilm production was performed by bacterial culture in Congo Red Agar (CRA). Of the 58 CoPS strains analyzed, 64% were identified phenotypically and genotypically as *S. aureus*. Eight strains CoPS isolated from the milk showed the *seb* gene and one strain from the cheese was positive for the *sea* gene. No gene for SEs was detected in the strains of CoNS. As for the biofilm formation potential of the CoPS strains, 53% (31/58) were positive for the *icaA* gene alone, 5% (3/58) presented only the *icaD* gene and 27% (16/58) presented both *icaA* and *icaD* genes. In relation to the CoNS, 100% of the samples were positive for the *icaA* gene and 9% (4/46) presented the *icaA* and *icaD* genes simultaneously. Regarding the CRA test, 64% (67/104) strains of *Staphylococcus* spp. were positive and of these 7% (5/67) did not present any of the *icaA*, *icaD* and *icaC* genes tested. For the detection of the resistance profile, 103 strains were submitted to the antimicrobial susceptibility test, in which higher resistance indices were observed against PEN (41% CoPS) and (31% CoNS), AMO (40% CoPS), AMP (36% CoPS) e SUT (35% CoNS). Twenty-seven (26%) strains (18 CoPS and 9 CoNS) demonstrated a multiresistance profile and were resistant to at least three different classes of antimicrobials tested. Absence of *mecC* was observed in all strains, 12 strains (9 CoPS and 3 CoNS) were positive for *mecA* and 10 strains (4 CoPS and 6 CoNS) positive for *blaZ*. The high prevalence of *Staphylococcus aureus*, the presence of enterotoxin encoding genes, biofilm forming genes and antimicrobial resistance genes, as well as the presence of resistant and multiresistant strains show the potential for virulence of CoPS and CoNS, highlighting the importance of strict adherence to good food manufacturing practices. In addition, these results highlight a risk for veterinary clinics and public health, since these resistance genes can be transferred to humans or animals, making it difficult or even impossible to treat potentially curable diseases.

Key words: *Staphylococcus* spp., Enterotoxins, biofilm, resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em *Staphylococcus* spp..... 49

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de enterotoxinas e gene *femA* em *Staphylococcus* spp..... 50

Tabela 3: Caracterização fenotípica de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva 51

Tabela 4: Resultado do estudo fenotípico da produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo (CRA) e detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* de *Staphylococcus* coagulase positivo isolados do leite e queijo Artesanal Serrano 51

Table 5: Primers used for the detection of beta-lactam antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus* spp 65

Table 6: Resistance profile of CoPS and CoPN isolates isolated from milk and artisanal cheese from Santa Catarina. 66

Table 7: Percentage of detection of *mecA*, *mecC*, *blaZ* genes of CoPS and CoNS isolated from milk and Artisanal Cheese from Santa Catarina..... 67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	22
2.2	Enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificadores de enterotoxinas	23
2.3	Intoxicações Estafilocócicas.....	26
2.4	<i>Staphylococcus</i> spp. formadores de biofilme	28
2.5	Resistência a Antimicrobianos	31
2.6	Segurança Alimentar.....	33
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
4	ARTIGO 1.....	45
4.1	Introdução	46
4.2	Material e Métodos.....	47
4.3	Resultados	50
4.4	Discussão.....	52
4.5	CONCLUSÃO	56
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
5	ARTIGO 2.....	61
5.1	Introduction	62
5.2	Material and methods.....	63
5.3	Results	65
5.4	Discussion.....	67
5.5	Conclusion	69
5.6	References.....	70

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, em dois grandes grupos, estafilococos coagulase positivo (CoPS) e estafilococos coagulase negativo (CoNS). Sendo a maioria, coagulase negativas, com exceção do *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus pseudointermedius* e *S. aureus* subsp. *anaerobius* (MARKEY et al., 2013).

Os CoNS são frequentemente isolados de amostras clínicas humanas e animais, porém sua importância está relacionada com dados epidemiológicos e suspeita de resistência a glicopeptídeos e produção de outras exotoxinas (TEIXEIRA, 2009). Ademais, estudos tem demonstrado sua presença associada a surtos de intoxicações alimentares (ANDRADE et al., 2011).

Dentre os CoPS o *S. aureus* é a espécie de maior interesse, por serem altamente ativos biologicamente, além de produzirem várias exotoxinas, como as enterotoxinas (SILVA et al., 2010). A doença transmitida pelo alimento (DTA) causada pelos *S. aureus* é uma intoxicação alimentar, a qual ocorre após a ingestão de toxinas pré-formadas no alimento (SILVA et al., 2010). A intoxicação estafilocócica representa uma das doenças transmitidas por alimento (DTA) mais prevalentes no mundo (ECDC, 2015), embora, sua incidência na maioria das vezes seja subestimada devido a falhas no diagnóstico, dificultando o controle social e econômico da doença (YAN et al., 2012).

As enterotoxinas estafilocócias (SE) são proteínas de baixo peso molecular, resistentes a inativação por proteases estomacais, como a pepsina e a tripsina, e são termoresistentes (100°C/30 min.), podendo ser encontradas no alimento, mesmo na ausência de micro-organismos viáveis, devido ao efeito do tratamento térmico (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Elas são nomeadas em ordem alfabética de acordo com a cronologia de sua descoberta, sendo as enterotoxinas clássicas denominadas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os genes codificadores das SEs podem estar presentes em bacteriófagos (*sea* e *sec*), plasmídeos (*seb*, *sed* e *selj*), no cromossomo (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* e *selq*) e nas ilhas de patogenicidade cromossomal (*sec*, *seb*, *selk* e *selq*) (ZHANG et al., 1998; JARRAUD et al., 2001).

Além da produção de enterotoxinas, outra característica significativa de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies inertes quanto biológicas. Além disso, *Staphylococcus* spp. em biofilmes demonstram elevada resistência a antimicrobianos, comprometendo assim, a eficácia e o sucesso do tratamento (MATHUR et al., 2005). As cepas de *Staphylococcus* spp. *ica*-dependentes necessitam da presença e expressão do cluster *ica*, o qual comprehende os genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo, representado pelo operon *icaABCD* (ARCHER et al., 2011)

A formação de biofilme dentro da linha de produção, além de elevar a carga microbiana, gera muitos prejuízos devido a corrosão de superfícies e equipamentos e ao aumento da resistência a distintos antimicrobianos. Ademais, células bacterianas podem desprender-se do biofilme e iniciar um novo processo de fixação em outra superfície, ou até contaminar o alimento com bactérias deteriorantes ou patogênicas, constituindo um risco em potencial para os consumidores (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Outro fator importante relacionado ao gênero é a emergência de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes e/ou multirresistentes a antimicrobianos (FLEMING et al., 2010). No trato gastrointestinal as bactérias podem transferir genes que conferem resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não correlatas, patogênicas ou não. O aumento dessa resistência traz imensa preocupação para clínica veterinária e humana, uma vez que, pode dificultar o tratamento de doenças potencialmente curáveis (RAPINI et al., 2004).

Cada vez mais discutida e enfatizada, a segurança dos alimentos constitui um dos maiores desafios para os órgãos responsáveis pela saúde pública, visto que, produtos disponíveis para comercialização podem representar um risco à saúde do consumidor, quando as boas práticas de fabricação são negligenciadas (GUIMARÃES, 2012).

O leite e seus derivados estão entre os alimentos frequentemente associados a surtos de infecções estafilocócicas (SILVA et al., 2010). O queijo artesanal serrano, por sua vez, é um produto fabricado obrigatoriamente com leite cru e amplamente consumido na Serra Catarinense (CÓRDOVA et al., 2011). Destacando-se a importância dos cuidados com a qualidade da matéria prima, bem como, com as boas práticas de fabricação para que possa garantir um alimento inócuo ao consumidor.

Micro-organismos patogênicos e deterioradores podem contaminar o alimento em qualquer uma das etapas de produção, distribuição e consumo (FRANCO; LANDGRAF, 2008), principalmente, aqueles que são altamente manipulados como produtos artesanais (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO et al., 2010; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003). Ademais, estudos demonstram o isolamento de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* entre outras espécies, muitas vezes em quantidades acima daquela permitida pela legislação vigente, em queijos Artesanais Serrano de Santa Catarina (MELO et al., 2013 e PONTAROLO, 2017).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reactio*) é amplamente utilizada para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. A PCR é uma técnica altamente sensível, onde pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas, podem ser enzimaticamente amplificadas, de modo que, uma quantidade suficiente de material fica disponível para alcançar o limiar do "sinal" para detecção (KONEMAM et al., 2006).

De acordo com o disposto acima, observa-se a importância de identificar o perfil de virulência de cepas de CoPS e CoNS, isolados do Queijo Artesanal Serrano, quanto ao potencial enterotoxigênico, a capacidade de formar biofilme e a presença de resistência a antimicrobianos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos. Encontram-se amplamente distribuídos no mundo todo, como comensais da pele de animais e de humanos. Também são encontrados em membranas mucosas do trato respiratório superior e urogenital inferior e como transitórios no trato digestivo, sendo relativamente estáveis no meio ambiente (QUINN et al., 2005).

O gênero *Staphylococcus* se divide de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a sua produção correlacionada com a patogenicidade, no entanto, alguns CoNS, ocasionalmente, causam doença nos animais e no homem (QUINN et al., 2005). Pereira et al. (2001), comprovaram que *Staphylococcus* coagulase negativa também são capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais.

O *S. aureus* é a espécie de maior interesse (dentro do grupo dos CoPS) para a microbiologia de alimentos, por provocar intoxicações de origem alimentar bastante frequentes em nosso meio, principalmente nas épocas quentes do ano (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Apresentam crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, e suportam variação de pH entre 4 a 9,8. São tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna alimentos curados potenciais veículos para o crescimento desta bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O gene *femA* é muito utilizado para a identificação molecular de *S. aureus*, pois ele é específico para a espécie (BOEREMA, 2006).

Staphylococcus spp. tem sido amplamente estudados devido a produção de diversos fatores de virulência como as exotoxinas estafilocócicas. Enzimas e citotoxinas como hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, leucocidinas, hialuronidases, collagenases, toxinas esfoliativas, toxina da síndrome do tóxico e enterotoxinas representam essas exotoxinas (QUINN et al., 2005; BOYNUKARA et al., 2008).

A presença de *Staphylococcus* sp. é frequentemente detectada em alimentos de origem animal, principalmente aqueles excessivamente manipulados e sem passar por tratamento térmico durante seu processo de fabricação. Este micro-

organismo pode ser transmitido ao alimento por diversas fontes, tais como: matéria prima, manipulador, ambiente de processamento, armazenamento, transporte e distribuição, quando não tomados os devidos cuidados, contribuindo dessa forma para multiplicação microbiana e consequente produção de enterotoxinas (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010 e SALOTTI et al., 2006).

No homem este micro-organismo pode causar desde infecções benignas na pele como foliculite, impetigo e furúnculo, até doenças sistêmicas podendo levar à morte (CHAPAVAL et al., 2008). Ademais, quando as enterotoxinas produzidas no alimento são ingeridas, causam sintomas como dor de cabeça, náuseas, vômitos, cólica abdominal e prostração (LAMAITA et al., 2005).

Outra importante característica dos *Staphylococcus* sp. é a sua capacidade de formar biofilmes tanto em superfícies biológicas quanto inertes. Além de constituir um imenso problema para as indústrias alimentícias, pela disseminação de patógenos através do alimento, estafilococos em biofilmes apresentam elevada resistência a antimicrobianos (MATHUR et al., 2005; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

2.2 Enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificadores de enterotoxinas

As SE são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por *Staphylococcus* spp. durante a fase pós-exponencial do crescimento bacteriano. São resistentes a inativação por proteases estomacais, como a pepsina e a tripsina, e termoresistentes podendo ser encontradas no alimento mesmo na ausência do micro-organismo, uma vez que o agente, é eliminado facilmente por um processo comum de cocção (FRANCO; LANDGRAF, 2008), enquanto que as enterotoxinas resistem à temperatura de 121°C por até 28 min (PELES et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Segundo Kokan e Bergdoll (1987), são necessárias algumas condições para produção de SE no alimento como, cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. necessitam estar presente, o alimento deve ser um substrato para o crescimento bacteriano, tempo e temperatura apropriados para a produção da toxina. Além disso, a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) podem interferir na síntese de enterotoxinas estafilocócicas através da acidificação do meio, produção de

bacteriocinas, produção de peróxido de hidrogênio e competição nutricional (NOVICK, 2003). Algumas características do meio como atividade de água, pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e condições atmosféricas podem influenciar a produção de SEs (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

Para Argudin et al. (2010), apenas as exotoxinas que provocam êmese devem ser denominadas de SE, uma vez que, é uma característica típica de enterotoxinas. Aquelas SE sem ação emética comprovada pelo modelo experimental designado deve ser denominada SEL (Staphylococcal enterotoxin-like) (CHIANG et al., 2008). As enterotoxinas estafilocócicas possuem similaridade filogenética, estruturais, funcionais, homologia de sua sequência e são consideradas superantígenos (BALABAN; RASSOLY, 2000).

As SEs são denominadas superantígenos por induzir a resposta imune policlonal pela ligação direta no Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex - MHC*) de classe II nos receptores de células T, sem ser internalizadas e processadas como um antígeno normal, o que provoca a proliferação de células T e citocinas. Além do mais, afetam várias outras células do sistema imune como macrófagos, eosinófilos e células epiteliais (LARKIN et al., 2010).

Enterotoxinas são nomeadas em ordem alfabética de acordo com cronologia de sua descoberta (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Sendo classificadas em clássicas SEA, SEB, SEC, SED, SEE e não clássicas SEG, SEH, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEO, SEP, SEQ e SEU (DINGES et al., 2000; ARGUDIN et al., 2010).

Os genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes em bacteriófagos (*sea* e *sec*), plasmídeos (*seb*, *sed* e *selj*), no cromossomo (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* e *selq*) e nas ilhas de patogenicidade cromossomal (*sec*, *seb*, *selk* e *selq*) (ZHANG et al., 1998; JARRAUD et al., 2001). A presença de genes em elementos genéticos móveis viabiliza o processo de transferência horizontal de genes através da mobilidade de uma molécula de DNA de uma bactéria para outra (FERREIRA, 2001).

Dentre a SEs clássicas a SEA é a mais prevalente em intoxicações de origem alimentar. O gene *sea* é composto por 771 pb (pares de base), responsável pela síntese de 257 aminoácidos (BALABAN; RASSOLY, 2000). A SEA é expressa constitutivamente (sistema *agr* independente) e ainda não há informação sobre

mecanismos de regulação que controlem a expressão desta toxina (JOHLER e STEPHAN, 2010).

A SEB é produzida pelo gene *seb*, o qual é cromossomal em amostras clínicas e plasmidial nos demais isolados, este gene apresenta 798 pb e codifica uma proteína de 31,4 kDa (SOARES et al., 1997). Esta toxina foi utilizada como arma biológica na década de 70, pois quando inalada em doses elevadas vários órgãos são acometidos com evolução, na maioria das vezes, fatal (DINGES et al., 2000).

A SEC possui algumas variantes, nomeadas de SEC1, SEC2 e SEC3 de acordo com base nas diferenças antigênicas. O gene *sec1*, contém 801 pares de base e codifica uma proteína com 267 aminoácidos. SEC1 e SEC2 são os subtipos mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (SOARES et al., 1997).

A SED é a segunda SE mais comumente associada a doenças de origem alimentar. O gene *sed* codifica uma proteína com 258 aminoácidos, está localizado em um plasmídeo, o qual também carreia genes de resistência a penicilina (SOARES et al., 1997). A SED é produzida em pequenas quantidades, porém, cerca de 100 a 200 ng são suficientes para causar a intoxicação, principalmente nos constituintes do grupo de risco (crianças e idosos) (KOKAN e BERGDOLL, 1987).

A SEE é codificada pelo gene *see*, tendo este uma sequência homóloga ao *sea*. Ademais, a sequência do DNA indica que SEA, SED e SEE possuem de 53 a 84% de homologia (BALABAN; RASSOLY, 2000; DINGES et al., 2000).

A presença de genes codificadores de SEs nas cepas de *Staphylococcus* spp. não significa que a toxina estará presente também no alimento, mas indica o potencial enterotoxigênico da cepa, a qual em condições favoráveis poderá expressar a proteína (FRANCO e LANDGRAF, 2008). No entanto, a determinação do tipo de enterotoxina é de grande valor epidemiológico, pois pode determinar a fonte de contaminação. Uma vez que, foi demonstrado que SEA e SEB estão associadas a contaminação de origem humana, principalmente manipuladores de alimentos, e SEC e SED são associadas com contaminação de origem animal, geralmente bovinos e suínos (NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003).

A ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos como leite e seus derivados, principalmente queijos, tem sido demonstrada em muitos estudos (CHIANG et al.,

2008; CREMOSNESI et al., 2005; CUNHA et al., 2006; RALL et al., 2008; ROSEC e GIGAUD, 2002).

Holecková et al. (2002) relataram em sua pesquisa uma alta taxa (47,4%) de *Staphylococcus* enterotoxigênicos isolados de queijos produzidos com leite de cabra na Eslováquia, com prevalência de *seb* (36,8%), seguido de *sea* (5,3%) e *sea + seb* (5,3%). Gucukoglu et al. (2012), encontraram 13,7% (7/51) das cepas de *S. aureus*, provenientes de leite cru, positivas para os genes *sea* e *seb*.

Borelli et al. (2011), não encontraram os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de Queijo Minas produzidos com leite cru. Hunt et al. (2012) demonstraram que 83,2% das cepas isoladas de leite cru e de queijos relacionados não continham os genes codificadores de enterotoxinas pesquisados. Rosec e Gigaud (2002) também encontraram baixa incidência de genes de enterotoxinas (9/74) em seu estudo com *Staphylococcus* sp.

2.3 Intoxicações Estafilocócicas

Diversos são os fatores que contribuem para o desenvolvimento das doenças de origem alimentar como processo térmico ineficiente, manipuladores infectados, contaminação cruzada, falhas nos processos de higiene e sanitização, utilização de produtos impróprios, temperatura de estocagem inadequada entre outros (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Vários alimentos já foram incriminados em surtos de intoxicações estafilocócicas, dentre eles destacam-se, a carne, o leite e seus derivados. Bem como, alimentos muito manipulados durante a fabricação, ou os que permanecem a temperatura ambiente depois da preparação são os de maior risco em provocarem este tipo de intoxicação (SILVA et al., 2010).

A intoxicação estafilocólica é causada pela ingestão da toxina pré-formada no alimento contendo *Staphylococcus* enterotoxigênicos, dentre os quais, destaca-se o *S. aureus* (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). No Brasil, entre os anos de 2007 a 2017, a vigilância epidemiológica notificou que o *S. aureus* foi o segundo agente etiológico mais prevalente nas DTAs, ficando atrás apenas da *Salmonella* sp. e da *Escherichia coli*. Dentre os alimentos incriminados em surtos alimentares, leite e queijo, assumiram a sexta posição (BRASIL, 2017). Este fato representa um risco

potencial em termos de saúde pública, principalmente devido a produção de enterotoxinas, capazes de provocar intoxicação, poucas horas após sua ingestão.

O primeiro caso estudado de intoxicação alimentar estafilocócica data de 1894, por J. Denys e em 1914 M. Barber, ao ingerir propositalmente leite inoculado com *S. aureus*, reproduziu em si os sintomas da doença (JAY, 2005).

Cerca de 95% das intoxicações estafilocócicas são devido a presença das SEs clássicas (SEA – SEE) (CREMONESI et al., 2005). Carmo et al. (2004), detectaram a presença de SEA em surto envolvendo oito mil pessoas em Minas Gerais, Brasil. Sendo a maioria dos acometidos idosos acima de 65 anos e crianças com menos de 5 anos.

A severidade da intoxicação estafilocócica depende da susceptibilidade individual, da enterotoxina envolvida, bem como da quantidade de enterotoxina ingerida com o alimento. A exemplo disso, a intoxicação causada pela ingestão de SEB causa sintomas mais severos com menor quantidade requerida da toxina quando comparada com a intoxicação envolvendo a SEA (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A dose necessária de enterotoxina para causar a doença é muito baixa. Acredita-se que menos de 1 µg da toxina seja o suficiente para desencadear os sinais clínicos da intoxicação (LAMAITA et al., 2005). Para Franco e Landgraf (2008), a dose infectante encontra-se entre 0,015 µg e 0,375 µg de toxina. Enquanto Jay (2005), aponta a dose de 200 ng de toxina suficiente para causar a enfermidade. Essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* obtém valores entre 10^5 a 10^6 UFC/g de alimento (SANT'ANA; AZEREDO, 2005; SILVA et al., 2010).

Os sintomas da intoxicação incluem vômito, náuseas, dores abdominais, diarreia, dores de cabeça e queda na pressão. Esses sinais surgem logo após a ingestão do alimento contaminado (4 a 6h) e pode permanecer por até 48 horas. Trata-se de uma intoxicação não letal e casos mais graves envolvem crianças, idosos e imunossuprimidos, os quais compõem o grupo de risco (BALABAN; RASOOLY, 2001; LARKIN et al., 2010).

O diagnóstico da intoxicação alimentar estafilocócica é realizado através dos sinais clínicos, período de incubação e detecção de enterotoxinas no alimento. Todavia, o período de incubação também dificulta a identificação da doença, uma vez que, na maioria das vezes não há amostra suficiente do alimento ingerido, para que se faça o isolamento da toxina e assim se alcance o diagnóstico confirmativo.

Devido a esta dificuldade em confirmar o diagnóstico, sabe-se que os casos de intoxicações alimentares causadas por enterotoxinas estafilocócicas são subnotificados (SERIDAN et al., 2012).

2.4 *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme

A formação de biofilmes na superfície de equipamentos e utensílios é um dos problemas mais importantes para o setor de leite e derivados. Além de causar prejuízos decorrentes da diminuição da vida útil dos equipamentos, põe em risco a segurança microbiológica do alimento, os biofilmes, propiciam o aumento da resistência bacteriana a sanitificantes e outros antimicrobianos, dificultando ou até mesmo impedindo o seu controle e eliminação (OLIVEIRA, BRUGNERA, PICCOLI, 2010).

Na indústria de leite e derivados, resíduos como proteínas e sais minerais (fosfato e cálcio), geralmente são componentes da matriz de biofilmes em tanques e tubulações (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006). Portanto, a elaboração de um plano de limpeza e desinfecção eficiente é de extrema importância para as indústrias alimentícias, a fim de, evitar a formação de biofilmes (MURGA, 2011).

Biofilmes são definidos como uma comunidade de micro-organismos aderidos a uma superfície e envoltos por uma matriz polimérica de síntese própria, constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominados em conjunto de exopolissacarídeos (EPS). A matriz proteica de biofilmes formados por *Staphylococcus* sp. é composta de poli-N-acetil-glicosamina (PIA). Biofilmes podem ser homogêneos, constituído de apenas uma espécie (raro), ou heterogêneo, constituído de várias espécies bacterianas ou até mesmo fungos, leveduras, algas e outros organismos unicelulares (SAUER et al., 2007).

Em biofilmes heterogêneos, os subprodutos metabólicos de um micro-organismo podem favorecer o crescimento de outra espécie, bem como, a adesão de uma espécie pode fornecer sítios de ligação e fixação para outras espécies bacterianas (DUNNE, 2002).

Cerca de 97% da matriz de um biofilme é constituída por água. Esse valor corresponde tanto a água intracelular, quanto a água livre circundante, a qual, juntamente com os solutos determinam a viscosidade da matriz e as condições de

difusão de solutos em seu interior, como nutriente e metabólitos (SUTHERLAND, 2001).

A formação de biofilmes segundo Notermans, Dormans e Mead, (1991) ocorre em três fases: adesão, consolidação e colonização. Na primeira fase de adesão, forças físicas permitem a aderência das células bacterianas a quase todos os tipos de superfícies, porém esta adesão é reversível. Na fase seguinte de consolidação, as bactérias iniciam a produção de uma matriz de substâncias extracelulares denominada exopolissacarídeo (EPS), essa matriz provoca uma adesão irreversível. Na terceira e última etapa a colonização, a camada de EPS permite o estabelecimento e multiplicação das células bacterianas na superfície, originando o biofilme propriamente dito, com consequente liberação das células para o meio circundante.

A manutenção das atividades de um biofilme está profundamente relacionada com mecanismos de *quórum-sensing*. Através da produção e liberação de moléculas sinalizadoras e auto-indutoras, as quais a concentração aumenta em função da densidade populacional bacteriana. Bactérias possuem a habilidade de perceber um determinado limiar de estimulação dessas moléculas auto indutoras, incitando alterações na expressão gênica e, consequentemente, em um comportamento. Dessa forma, bactérias de um biofilme podem sincronizar suas atividades funcionando como organismos multicelulares (WATERS, 2005).

Em um biofilme as células bacterianas possuem características fisiológicas diferentes de bactérias planctônicas. Isso devido a troca genética e consequente expressão gênica que o ambiente proporciona, contribuindo para que, as bactérias sejam por exemplo, mais resistentes a ação de vários antimicrobianos com distintos mecanismos de ação (MONROE, 2007).

Ademais, biofilmes microbianos formados em superfícies de instalações ou equipamentos de indústrias alimentícias podem liberar células bacterianas, as quais podem contaminar o alimento e/ou colonizar uma nova superfície iniciando um novo biofilme, gerando assim, uma nova fonte de contaminação (NORWOOD & GILMOUR, 1999).

FREEMAN et al. (1989), desenvolveram um método alternativo com alta sensibilidade e rapidez para determinar a produção de biofilmes em SCoN, denominado Ágar Vermelho Congo (CRA). Baseado na cultura de cepas bacterianas em ágar infusão cérebro coração (BHIA) e o critério de avaliação baseado na análise

visual da coloração das colônias que crescem no ágar. O mecanismo exato da reação é desconhecido pelo autor, embora acredita-se que a mudança de cor acontece nas fases finais da incubação bacteriana, processo oriundo da formação de um produto secundário. Estudos tem demonstrado que este método apresenta baixa acurácia, porém é um teste barato e de fácil realização (HASSAN et al., 2011)

Os mecanismos envolvidos na expressão de proteínas de fixação e na expressão de EPS, bem como, sua participação na formação de biofilmes de estafilococos, não são totalmente elucidados. Diante disso, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de compreender melhor estes mecanismos (ATKIN, 2014).

A matriz proteica de biofilmes formados por *Staphylococcus* sp. é composta de poli-N-acetil-glicosamina (PIA). A importância do operon *icaABCD* para a formação da PIA e consequente formação de biofilme já é estabelecida, considerando este, um importante mecanismo de patogenicidade do gênero *Staphylococcus*. Porém, em algumas cepas de *S. aureus* a expressão de biofilme ocorre independente a expressão do operon *icaABCD*, pois a produção de uma ampla variedade de proteínas de adesão permite o estabelecimento do biofilme (LASA e PENADÉS, 2006).

No entanto, nas cepas *ica*-dependentes a presença e expressão do cluster *ica* é fundamental, pois ele comprehende tanto os genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo de adesão, seja de superfície ou intercelular, representado pelo operon *icaABCD*, quanto genes responsáveis pela regulação da expressão da síntese, representado pelo gene *icaR* (ARCHER et al., 2011)

Com a expressão do gene *icaA* isoladamente ocorre reduzida expressão de biofilme, uma vez que esse gene codifica a enzima, N-acetilglicosamina transferase, responsável pela produção do polissacarídeo PIA em pequenas quantidades. Porém, com a expressão concomitante dos genes *icaA* e *icaD*, há um considerável aumento na produção dessa enzima, potencializando a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* (Martin, 2015). A expressão do gene *icaC* parece codificar uma N-diacetilase de PIA. Enquanto que, o gene *icaC* não parece desempenhar um papel funcional no mecanismo de biossíntese do EPS, sendo responsável apenas por modificar a estrutura do polissacarídeo (ATKIN et al., 2014).

A regulação gênica da produção de biofilme é altamente complexa. O gene *icaR* pode regular a expressão tanto positivamente através da expressão do

regulador Spx (regulador global de resposta ao estresse celular), quanto negativamente com a expressão do Rbf (proteína regulatória da formação de biofilme) (ARCHER et al., 2011)

Giardini (2013) demonstrou em seus estudos que dos 132 isolados de *S. aureus* testados para os genes *icaA* e *icaD*, apenas (27,3%) apresentaram um ou ambos os genes, o gene *icaD* foi o mais prevalente em (14,4%), seguido pela presença de ambos os genes (8,3%), enquanto *icaA* foi o gene menos prevalente (4,5%). Em sua pesquisa Santos (2009) verificou que 15 (36,6%) das 41 cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas para o gene *icaA* e 100% positivas para o gene *icaD*.

2.5 Resistência a Antimicrobianos

Nas últimas décadas observou-se a emergência de cepas multirresistentes, devido a pressão seletiva causada pelos antimicrobianos utilizados indiscriminadamente na medicina veterinária e humana (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; FLEMING et al., 2010). O uso inadequado de antimicrobianos e na maioria das vezes sem o conhecimento da sensibilidade do micro-organismo frente aos seus principais grupos, geram falhas e insucesso no tratamento (CHA; VAKULENKO; MOBASHERY, 2007);

Dentre os fatores preocupantes no setor agrícola, destaca-se o uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças, como a mastite e também na suplementação na alimentação animal (CORBIA et al., 2000). Assim, o aumento de resíduos de antimicrobianos no leite propicia a seleção de cepas resistentes neste produto e em seus derivados (CHA; VAKULENKO; MOBASHERY, 2007).

Bactérias oriundas de alimentos de origem animal demonstram, frequentemente, perfil de resistência e multirresistência a antimicrobianos utilizados no tratamento de diversas doenças. Tornando-se risco para saúde pública, por dificultar ou até mesmo impossibilitar o tratamento de doenças humanas e de animais potencialmente curáveis (RODRIGUEZ e VESGA, 2005; ARAÚJO; GALDINO; AMARAL, 2011).

A resistência bacteriana associa-se a existência de genes que codificam diversos mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de alguns fármacos. Devido ao

risco de transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes, o consumo de alimento de origem animal contendo estes micro-organismos constitui um problema para saúde pública, dado que, o aumento da resistência bacteriana nos humanos pode ser devido à transmissão, de cepas resistentes, pelos alimentos de origem animal (STÖHR; WEGENER, 2000).

Linhagens de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos constituem um problema de ordem mundial e o controle de sua disseminação é um fato preocupante para os profissionais da saúde (BAGGESEN e AARESTRUP, 1998).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Neste grupo encontram-se as penicilinas naturais e sintéticas, as cefalosporinas, carbapenemas e monobactans. Esses antimicrobianos têm como principais alvos de ação as enzimas que atuam nas etapas finais da formação da parede celular bacteriana. Tais enzimas, são proteínas de membrana, que se ligam aos antimicrobianos beta-lactâmicos e por isso são denominadas de proteínas de ligação à penicilina PBP (*penicillin binding protein*). Esta ligação impede que as enzimas realizem sua atividade de transpeptidase, endopeptidase e glicoxidase, levando à alteração na formação da camada de peptidoglicano da parede celular, contribuindo para a morte bacteriana por um processo ainda pouco conhecido (ANVISA, 2007).

A resistência aos beta-lactâmicos tem sido associada principalmente a dois mecanismos. O primeiro mecanismo é a produção de uma enzima extracelular β -lactamase, essa enzima produzida pela bactéria é capaz de degradar os antimicrobianos β -lactâmicos (CHAMBERS, 1997). A β -lactamase é codificada pelo gene *blaZ*, frequentemente plasmidial, podendo ser cromossomal, caracterizando uma resistência constitutiva ou regulada pela presença da droga (LOWY, 2003).

Este fato levou ao desenvolvimento de penicilinas resistentes às β -lactamases, como alternativa ao tratamento das doenças infecciosas. No caso das infecções estafilocócicas, a oxacilina e a meticilina, passaram a ser antimicrobianos de primeira escolha no tratamento das enfermidades causadas por estas bactérias (LOWY, 2003).

O segundo mecanismo é a produção de uma proteína de baixa afinidade a penicilina (PBP2a), a qual possui baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos, permitindo assim, a síntese da parede celular mesmo na presença do antibiótico (PINCHUK et al., 2010). Os estafilococos produzem quatro tipos de PBPs,

designadas PBP1 a 4. As cepas resistentes expressam o subtipo PBP2a ou PBP2' (KATAYAMA et al., 2000). Sendo está codificada pelo gene *mecA* (LOWY, 2003; PINCHUK et al., 2010).

O gene *mecA* está inserido em um elemento genético móvel denominado de cassete cromossômico estafilocóccico *mec* (*SCCmec*), localizado em um sítio específico do cromossomo estafilocócico (*attBsc*c), próximo ao ponto de origem de replicação do DNA flanqueado por sequências diretas e repetidas (KATAYAMA et al., 2000).

Um gene apresentando cerca de 70% de nucleotídeos homólogos ao *mecA*, denominado *mecC*, foi encontrado em cepas de *S. aureus* de bovinos e subsequentemente em *S. aureus* de humanos, no entanto, pouco se conhece ainda sobre a sua funcionalidade (PICHON et al., 2012).

O sucesso terapêutico dos antimicrobianos depende de seu uso adequado. Nesse contexto, O teste de suscetibilidade avalia a resistência dos micro-organismos contra diferentes agentes antimicrobianos, auxiliando assim, na escolha terapêutica antimicrobiana adequada (CLSI, 2014).

2.6 Segurança Alimentar

A segurança alimentar é foco de preocupação para as indústrias alimentícias, para os consumidores, para os órgãos fiscalizadores responsáveis pela saúde pública, uma vez que produtos disponíveis para comercialização podem conter micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos. Corroborando com a necessidade e importância de seguir com rigor as boas práticas de fabricação durante o processo de produção (GUIMARÃES, 2012).

Uma série de micro-organismos patogênicos frequentemente contaminam os alimentos, podendo representar um risco à saúde do consumidor, pela capacidade de causar intoxicações ou toxininfecções, através da ingestão de células viáveis ou de seus metabólitos tóxicos, respectivamente (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Os micro-organismos patogênicos estão amplamente distribuídos no ambiente, assim sendo, as principais fontes de contaminação do alimento são: solo, água, plantas, utensílios, trato intestinal do homem e de animais, manipuladores de alimentos, ração animal, animais, ar e pó (FORSYTHE, 2007; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Portanto, produtos crus utilizados como ingredientes podem carrear contaminação patogênica (FORSYTHE, 2007).

O leite é considerado um alimento completo para a dieta humana pela sua composição altamente nutritiva. De forma semelhante, constitui um meio de cultura adequado para o crescimento de diversos micro-organismos (inclusive os patogênicos). Uma variedade de fatores como: manejo, alimentação e potencial genético do rebanho, obtenção e armazenagem, influenciam na qualidade do leite cru (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O queijo é um importante derivado do leite, tanto pela sua grande aceitação por parte dos consumidores, como pelo seu valor nutritivo (ARAÚJO et al., 2001). No entanto, é frequentemente considerado um veículo de patógenos de origem alimentar, principalmente, queijos frescos artesanais não maturados devidamente (FEITOSA et al., 2003).

O queijo artesanal serrano é fabricado com leite cru de bovinos de diversas raças, bem como seus cruzamentos (desde animais mais especializados para produção de leite até raças de corte e mista), alimentados à base de pastagens naturais. O queijo é feito logo após a ordenha com a adição do coalho e acidificação de forma artesanal, separado do soro e maturado durante tempo variável (CÓRDOVA et al., 2011).

É um produto marcado pela heterogeneidade dos processos de produção, pois não há padronização nas técnicas de fabricação entre as propriedades produtoras, resultando na grande diversidade de composição, formato e peso dos queijos. Falhas no controle de boas práticas de fabricação podem resultar em um produto de má qualidade, constituindo um risco para saúde do consumidor (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007; KRONE e MENASCHE, 2010).

A fabricação de produtos artesanais, como o queijo serrano, necessita seguir rigorosamente os processos de autocontrole e a matéria prima (leite) deve ser oriunda de animais em condições sanitárias adequadas. Da mesma forma, as condições de processamento, armazenamento e comercialização, podem comprometer suas características sensoriais, bem como, tonar o produto impróprio para o consumo humano, pela contaminação por micro-organismos indesejáveis (ARAÚJO et al., 2001; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

Entre os patógenos que podem ser encontrados contaminando o leite e seus derivados, causando surtos ou casos de intoxicações ou toxinfecções estão a

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e a *Listeria monocytogenes*. Considerando a importância destes agentes para saúde pública, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, determina os limites máximos para estes micro-organismos nos alimentos (BRASIL, 2001).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, A. P. C.; Borges, M. F.; Figueiredo, E. A. T.; Machado, T. F.; Porto, B. C. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho / – Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2011.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – **Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2007. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/servicosaudae/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos.htm

ARAÚJO, J. M.; GALDINO, M.; AMARAL, S. M. MRSA de origem comunitária. **Residência Pediátrica**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 39-40, 2011.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. H.; MARTINEZ, T. C. N.; SILVEIRA, V. F.; BARROS, S. L. B.; SILVA, A. A. F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 37 – 42, 2001.

ARCHER, N. K; MAZAITIS, M. J; COSTERTON, J. W; LEID, J. G; POWERS, M. E; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
 DOI:10.4161/viru.2.5.17724

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
 doi:10.3390/toxins2071751

ATKIN, K. E.; MACDONALD, S. J.; BRENTNALL, A. S.; POTTS, J. R.; THOMAS, G. H. A different path: Revealing the function of staphylococcal proteins in biofilm formation. **FEBS Letters**, v. 588, p. 1869–1872, 2014.

BAGGESEN, D. L.; AARESTRUP, F. M. Characterisation of recently emerged multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds. **The Veterinary record**, v. 143, n. 4, p. 95-7, 1998. DOI: 10.1136/vr.143.4.95

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of **Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)

BOEREMA, J. A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. "Evaluation of Molecular Methods to Determine Enterotoxicigenic Status and Molecular Genotype of Bovine, Ovine, Human and Food Isolates of *Staphylococcus aureus*," **International Journal**

of Food Microbiology, Vol. 107, No. 2, 2006, pp. 192-201.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p. 481-487, 2011. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>

BOYNUKARA, B., GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 209-211, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução, RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2007 – 2017.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A. J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 254 – 262, 2006. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004)

CARMO, L. S. D.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R. K.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004. DOI:[10.1089/fpd.2004.1.241](https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.241)

CHA, J.; VAKULENKO, S. B. MOBASHERY, S. Characterization of the b-lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Biochemistry**, Montreal, v. 46, n. 3, p. 7822-7831, 2007.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 781-791,1997.

CHAPAVAL, L.; LUA, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 299-306, 2008.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan.

International Journal of Food Microbiology, v. 121, n. 1, p. 66-73, 2008.
doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.005

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. S. *aureus*: importância para saúde pública e aspectos epidemiológicos. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p.15, 2000. ISSN 0104-6187.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2011.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; CASTIGLIONI, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, 19, 299–305.
<https://doi.org/10.1016/J.MCP.2005.03.002>

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; JÚNIOR, J. P. A. DETECTION OF ENTEROTOXINS GENES IN COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM FOODS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70-74, 2006. ISSN 1517-8382.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M.; Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviewa**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002. Doi: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, Stockholm, v. 13, n.1, 162p., 2015.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004. ISSN 0103-8478

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

FERREIRA, H. B. Organização Gênica de Procariotos. In: _____. ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. p. 64-77.

FLEMING, L. R.; BOLZAN, D. N.; BANDEIRA, S. O.; NASCIMENTO, J. DOS S. QUANTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Staphylococcus* ISOLADOS DE QUEIJOS. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2, n.1/2, p.13-19, 2010

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2007.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.

FREEMAN, D. J.; F R FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 2008.

GIARDINI, L. K. **IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS CLONais, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILMES (*icaA* e *icaD*) EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE BOVINO.** 2013. 92p. Tese (Doutor em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina Veterinária – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária. Porto Alegre-Rio Grande do Sul 2013.

GÜCÜKOGLU, A.; KEVENK, T. O.; UYANIK, T.; CADIRCI, O.; TERZI,G.; ALISARLI, M. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, 2012. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02954.x

GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. C. V.; AZEVÊDO, P. F.; MENESSES, R. B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.2, p.259-265, 2012. ISSN: 0073-9855 - e-ISSN: 1983-3814

HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F.; OMAIR, M.; MUHAMMAD, A. K. IQBAL. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 305-311, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70197-0](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70197-0)

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINÁCOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 179-182, 2002. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>

HUNT, K.; SCHELIN, J.; RÅDSTRÖM, P.; BUTLER, F.; JORDAN, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 5, p. 487-499, 2012. DOI:10.1007/s13594-012-0067-4

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *etc, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*.* **Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.669>.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. *Staphylococcal food poisoning: a current review.* **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220-228, 2010. DOI: 10.2376/0003-925X-61-220

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, *staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1549–1555, 2000.

KOKAN, N. P.; BERGDOLL, M. S. Detection of low-enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2675 – 2676, 1987.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Cocos gram positivos: Parte 1. **Estafilococos e microrganismos relacionados** In: **diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido, 5^a ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, p. 619 – 646, 2006.

KRONE, E.E.; MENASCHE, R. Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS): práticas, saberes e modos de vida de pecuaristas familiares produtores do queijo serrano. **Ateliê Geográfico**, Goiânia, v. 4 n. 10, p. 61 – 85, 2010.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LARKIN, E. A.; KRAKAUER, T.; ULRICH, R. G.; STILES, B. G. Staphylococcal and Streptococcal Superantigens: Basic Biology of Conserved Protein Toxins. **The Open Toxinology Journal**, n. 3, p. 69-81, 2010.

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99-107, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003. DOI: 10.1172/JCI200318535

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2 ed. Dublin: Mosby Elsevier, 2013.

MARTIN, J. G. P. **Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de iaticínios produtores de queijo Minas Frescal**. 2015. 102p. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura e “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2015.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.; FATMA, T.; RATTAN, A. Adverse Effect os Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides. **Japanese Journal of Infectious Disease**, Toyana, v. 58, p. 353-357, 2005.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; THALER NETO, A.; KNACKFUSS VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Avaliação da inocuidade e qualidade do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1152, p. 1 – 7, 2013. ISSN 1679-9216

MONROE, E. D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PloS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 2458-2461, 2007. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307

MURGA, R.; FOSTER, T. S.; BROWN, E.; PRUCKLER, J. M.; FIELDS, B. S.; DONLAN, R. M. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. **Microbiology**, v. 147, n. 11, p. 3121-3126, 2001. DOI:10.1099/00221287-147-11-3121

NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of Two Multiplex Polymerase Chain Reactions for the Detection of Enterotoxigenic Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 1055–1062, 2003.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria mocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 576-582, 1999.

NOTERMANS S. DORMANS J.A.M.A. MEAD G.C. (1991) Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v. 5, p. 21–36, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927019109378226>

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1429-1449, 2003. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; Hilsdorf PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÀLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F. HOZ PERALES, L. de la.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 186–193, 2007. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.010

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. COMPORTAMENTO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS PAUCIPRODUTORES DE ENTEROTOXINAS, EM ALIMENTOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS. **Ciência Tecnologia Alimentares**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001

PICHON, B.; HILL, R.; LAURENT, F.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; HOLMES, M.; EDWARDS, G. F.; TEALE, C.; KEARNS, A. M. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton–Valentine leucocidin (), *mecA* and homologue *mecALGA251*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p. 2338–2341, 2012. doi:10.1093/jac/dks221.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. *Staphylococcal* Enterotoxins. Toxins, Basel, v. 2, p. 2177-2197, 2010. doi:10.3390/toxins2082177

PONTAROLO, G. H.; MELO, F. D.; MARTINI, C. L.; WILDEMANN, P.; ALESSIO, D. R. M.; SFACIOTTE, R. A. P.; THALER NETO, A.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Qualidade e inocuidade de queijos artesanais produzidos na região serrana em Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 739-748, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n2p739.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artemed, 2005.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR., A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAÚJO JR., J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 408–413, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.011>

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. p.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.130-33, 2004/ ISSN 1678-4162

RODRIGUEZ, C. A.; VESGA, O. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. **Biomédica**, v. 25, p. 575 - 587, 2005.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1–2, p. 61-70, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00044-2)

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado

no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Bológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrefilm rsa® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001. ISSN 1678-457X

SANTOS, S. S. INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR ESTAFILOCOCOS EM MICRO-USINA DE BENEFICIAMENTO DE LEITE. 2009. 57f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” - FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS. Jaboticabal – São Paulo. 2009

SAUER, K., RICKARD, A. H. & DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R.; CARMO, L. S.; MENEZES, L. D. M.; OLIVEIRA, D. L. S.; ANDRADE, E. H. P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.465-470, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

SOARES, M. J. S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H.; NOLETO A. L. S.; FIGUEIREDO, A. M. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (1II::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 46, n. 2, p. 14-22, 1997.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Animal use of antimicrobials: impact on resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 4, p. 207-209, 2000.
<https://doi.org/10.1054/drup.2000.0151>

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)

TEIXEIRA, C. F. **Estafilococos coagulase-negativa – um risco real para a saúde pública**. 80 f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

WATER, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bactéria. **Annual Review of Cell and Development Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 319-46, 2005. DOI: doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

YAN, X.; WANG, B.; TAO, X.; HU, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; LIN, Y.; YOU, Y.; SHI, X.; GRUNDMANN, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6637-6642, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01165-12

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais Comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 003, p. 862 – 867, 2007. ISSN 0103 – 8478

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C.; The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

4 ARTIGO 1

Detecção do potencial de formação de biofilme em CRA e dos genes *icaA* *icaC* e *icaD* e genes enterotoxigênicos em *Staphylococcus* spp. isolados do leite e do Queijo Artesanal Serrano de Santa Catarina

RESUMO

Os estafilococos são frequentemente associados a surtos de intoxicação alimentar. Dentre os alimentos envolvidos nesses surtos encontram-se o leite e seus derivados, principalmente queijos produzidos artesanalmente e com leite cru. Este trabalho objetivou identificar *Staphylococcus* coagulase positiva, verificar o potencial enterotoxigênico através da pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), verificar a capacidade de produzir biofilme através do Ágar Vermelho Congo (CRA) e identificar a ocorrência dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, em cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas do leite e do queijo artesanal serrano. Para este estudo foram testadas 58 isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo (CoPS) e 46 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), totalizando 104 amostras bacterianas, isoladas do leite (33 isolados) e de seus respectivos queijos (71 isolados) artesanais serrano, produzidos na região serrana de Santa Catarina. A técnica de PCR multiplex foi utilizada para a pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* codificadores de enterotoxinas, bem como, para a pesquisa dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, os quais participam dos mecanismos de formação de biofilme. A produção fenotípica de biofilme foi realizada pelo cultivo bacteriano em Ágar Vermelho Congo (CRA). Das 58 cepas de CoPS analisadas 64% foram identificadas fenotípica e genotipicamente como *S. aureus*. Oito cepas CoPS isoladas do leite apresentaram o gene *seb* e uma cepa oriunda do queijo foi positiva para o gene *sea*. Nenhum gene para as SEs foi detectado nas cepas de CoNS. Quanto as cepas CoPS, 53% (31/58) foram positivas para o gene *icaA* isoladamente, 5% (3/58) apresentaram somente o gene *icaD* e 27% (16/58) apresentaram ambos os genes *icaA* e *icaD*. Em relação aos CoNS 100% das amostras foram positivas para o gene *icaA* e 9% (4/46) apresentaram, simultaneamente, os genes *icaA* e *icaD*. Quanto ao teste do CRA, 64% (67/104) cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas e destas 7% (5/67) não apresentaram nenhum dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* testados. A presença de genes codificadores de enterotoxinas e genes formadores de biofilme, evidenciam o potencial de virulência dos CoPS e CoNS, destacando a importância de serem seguidas rigorosamente os processos de autocontrole na fabricação do alimento. A fim de, assegurar um alimento inócuo ao consumidor.

4.1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se diferenciam de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase negativas, com exceção do *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini* (QUINN, et al. 2005). *S. aureus* é a espécie considerada de maior importância dentre os *Staphylococcus* sp., pela sua capacidade de produzir várias exotoxinas, especialmente as enterotoxinas. Porém, Valle et al. (1990) descreveram que outros estafilococos produtores de coagulase possuíam a mesma característica. Posteriormente, Pereira et al. (2001) comprovaram que *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS) também foram capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais.

As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes a inativação por proteases estomacais e são termoresistentes (100°C/30 min.), podendo ser encontradas mesmo em alimentos pasteurizados (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Para Franco e Landgraf (2008), a dose necessária para induzir a manifestação clínica encontra-se entre 0,015 µg a 0,375 µg de toxina. Essa quantidade é produzida quando a população de *S. aureus* atinge valores entre 10⁵ a 10⁶ UFC/g de alimento (SANT'ANA; AZEREDO, 2005; SILVA et al., 2010). As SEs são nomeadas em ordem alfabética de acordo com a cronologia de sua descoberta, sendo as enterotoxinas clássicas denominadas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes em bacteriófagos (*sea* e *sec*), plasmídeos (*seb*, *sed* e *selj*), no cromossomo (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* e *selq*) e nas ilhas de patogenicidade cromossomal (*sec*, *seb*, *selk* e *selq*) (ZHANG et al., 1998; JARRAUD et al., 2001).

Outra característica importante, principalmente para indústria alimentícia dos *Staphylococcus* sp. é quanto produção de biofilme. A formação de biofilme gera muitos prejuízos devido a corrosão de superfícies e equipamentos, mas principalmente, pelo aumento da resistência a sanitificantes e pela contaminação dos produtos por bactérias deteriorantes ou patogênicas (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Nas cepas de *Staphylococcus* sp. *ica*-dependentes, a presença e expressão do cluster *ica* é fundamental, pois ele genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo de adesão, representado pelo operon *icaABCD*, (ARCHER et al., 2011)

Segundo o Serviço de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde, *S. aureus* foi o terceiro patógeno mais frequente em surtos com o agente etiológico conhecido, nos anos entre 2007 a 2017 (BRASIL, 2017).

Este fato representa um risco potencial em termos de saúde pública, principalmente devido a produção de enterotoxinas, capazes de provocar intoxicação, poucas horas após sua ingestão. O leite e seus derivados estão entre os alimentos frequentemente contaminados por *Staphylococcus* sp. (SILVA et al., 2010), principalmente aqueles que são altamente manipulados como produtos artesanais (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO, 2010; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003), incluindo o queijo artesanal serrano (MELO et al., 2013; PONTAROLLO et al., 2017), desta forma, o controle deste micro-organismos em sua cadeia produtiva é urgente e imprescindível para que se garanta a qualidade do produto.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial enterotoxigênico através da pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), verificar a capacidade de produzir biofilme através do Ágar Vermelho Congo (CRA) e identificar a ocorrência dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, em cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas do leite e do queijo artesanal serrano.

4.2 Material e Métodos

Para este estudo foram testadas 58 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (CoPS) e 46 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), totalizando 104 amostras bacterianas, isoladas do leite (n=33) e de seus respectivos queijos (n=71) artesanais serrano, produzidos na região serrana de Santa Catarina. Estas amostras eram mantidas a -20°C em caldo BHI (Brain heart infusion broth) com glicerol a 20%. Para a realização deste trabalho as amostras foram recuperadas e purificadas em ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C.

Para a caracterização fenotípica dos CoPS, foram utilizados os testes de coagulase, Vogues-Proskauer, urease, resistência a polimixina B e fermentação do manitol, trealose e sacarose (QUINN et al.,2005; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

A produção de biofilme para as cepas de *Staphylococcus* sp. foi realizada pelo cultivo bacteriano em Ágar Vermelho Congo (CRA), modificado de Freemann et al. (1989), constituído de ágar nutritivo 28 g/L, sacarose 50 g/L e corante Vermelho Congo 0,8 g/L. Os isolados bacterianos foram semeados em placas CRA, incubadas à temperatura de 36°C por 24 horas, seguida de incubação à temperatura ambiente (20°C) por 18 horas. A produção de colônias rugosas e pretas foram consideradas estirpes produtoras de biofilme, quando acompanhadas pela mudança da coloração do meio adjacente para preto, porém, as colônias lisas e vermelhas foram consideradas como não produtoras de biofilme (FREEMANN et al. 1989).

Para extração do DNA utilizou-se a técnica padronizada pelo Laboratório de Microbiologia Animal do Campus Regional de Umuarama (CAU), Universidade Estadual de Maringá (UEM). Extração foi realizada pelo método cloroformio/ álcool-isoamílico (CIA). Utilizou-se 200 µL do inóculo (colônias foram previamente incubadas em 200 µL de cado BHI), foi adicionado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e aquecido em banho-maria por 30 minutos a 56°C. Após o aquecimento, foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e acrescido de 600 µL de álcool 70% gelado. Em seguida, realizou-se uma segunda centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos. Após desprezou-se o sobrenadante e o microtudo foi colocado na estufa a 56°C para sua completa secagem. O DNA foi suspenso em água ultrapura estéril, homogeneizado e estocado a -20°C até sua utilização.

Para detecção dos genes do complexo *ica* utilizou-se a técnica de PCR - Multiplex, segundo metodologia descrita por Arciola et al. (2005), onde as reações foram constituídas de 2 uL de DNA extraído, 0,4 pmol de cada primer (Tabela 1) para os genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, 400mM de cada dNTP, 1x PCR tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase, com volume final da reação com 25 uL. As condições de tempo e temperatura foram de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos com as etapas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54° C por 30 segundos e

extensão a 72°C por 1 minuto, terminando em uma etapa final de extensão a 72°C por 2 minutos.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em *Staphylococcus* spp.

gene	Sequência 5' - 3'	Amplificação	Referência
<i>IcaA</i>	F - ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103 pb	Arciola et al., 2005
	R - GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC		
	F – ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG		
<i>IcaD</i>	R - CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198 pb	
<i>IcaC</i>	F - TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT T	400 pb	
	R - TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG		

Para detecção dos genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *see* e *sed*) e gene *femA*, utilizou-se a técnica de PCR - Multiplex, baseada na metodologia padronizada por Freitas (2005). As reações foram constituídas de 2 uL de DNA extraído, 0,4 pmol de cada primer (Tabela 2) para os genes e *femA*, 200mM de cada dNTP, 1x PCR tampão, 2 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase, com volume final de 25 uL. As condições de tempo e temperatura foram de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com as etapas de desnaturação a 94°C por 2 min., anelamento a 52° C por 2 min. e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando em uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos. As reações foram divididas em dois Multiplex- PCR, um contendo os primers (*sea*, *sec* e *see*) e outro contendo (*seb*, *sed* e *femA*).

As cepas de *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*) foram utilizadas como controle positivo. Como controle interno da reação utilizou-se o gene 16S e como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de enterotoxinas e gene *femA* em *Staphylococcus* spp.

Primer	Sequência 5' - 3'	Amplificação	Referência
Sea	F – GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	102 pb	
	R – CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG		
Seb	F – GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	164 pb	
	R – CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG		
Sec	F - AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	451 pb	Freitas, 2005
	R – CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG		
sed	F – CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG	278 pb	
	R – ATT GGT ATT TTT TTT CGT TCT		
see	F – AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC	209 pb	
	R – CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC		
<i>femA</i>	F – AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132 pb	
	R – GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG		
16S	F - AGG TGG CAA GCG TTA TCC	228pb	ASFOUR e DARWISH, 2011 (modificado)
	R - CGC ACA TCA GCG TCA G		

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com SyBR® safe e visualizados sob luz UV.

4.3 Resultados

Neste estudo foram utilizadas 104 cepas de *Staphylococcus* sp. de amostras de leite e de queijo Artesanal Serrano, destas, 58 foram classificados como CoPS e 46 como CoNS. O resultado da análise fenotípica do CoPS estão apresentados na tabela 3, no qual, observou-se uma predominância de *S. aureus* (64%) em relação aos demais. Todos as amostras identificadas como *S. aureus* apresentaram o gene *femA*.

Tabela 3: Caracterização fenotípica de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva

	<i>S. aureus</i>	<i>S. scheiferi coagulans</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	TOTAL
Leite	10 (50%)	4 (20%)	6 (30%)	0	20 (34%)
Queijo	27 (71%)	9 (24%)	1 (3%)	1 (3%)	38 (65%)
Total	37/58 (64%)	13/58 (22%)	7/58(12%)	1/58 (2%)	58

Das 58 cepas de CoPS nove (15,51%) foram positivas para algum dos cinco genes de enterotoxinas pesquisados. Das 20 cepas isoladas do leite 8 (40%) apresentaram o gene *seb*, sendo, cinco *S. aureus*, duas *Staphylococcus scheiferi coagulans* e uma *Staphylococcus hyicus*. Quanto as 38 cepas de CoPS isoladas do queijo apenas um *S. aureus* apresentou o gene *sea*. No total 16,21% (6/37) dos *S. aureus*, 15,38% (2/13) dos *S. scheiferi coagulans* e 14,28% (1/7) dos *S. hyicus* apresentaram genes de enterotoxinas. Todas as cepas de CoNS foram negativas para a presença dos genes de enterotoxinas pesquisados neste trabalho.

No presente estudo 70,68% (41/58) das cepas CoPS foram positivas para formação de biofilme em CRA, sendo que destas, 65% foram *S. aureus*, 24,39% *S. scheiferi* subsp. *coagulans*, 7,31% *S. hyicus* e 2,43% *S. intermedius* (Tabela 4) e 56,52% (26/46) das cepas CoNS foram positivas para formação de biofilme em CRA.

Tabela 4: Resultado do estudo fenotípico da produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo (CRA) e detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* de *Staphylococcus* coagulase positivo isolados do leite e queijo Artesanal Serrano

	Vermelho Congo	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaAD</i>	<i>icaC</i>
<i>S. aureus</i>	27 (65%)	21	1	12	0
<i>S. scheiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	10 (24%)	6	1	4	0
<i>S. hyicus</i>	3 (7%)	3	1	0	0
<i>S. intermedius</i>	1 (2%)	1	0	0	0
Total	41	31	3	16	0

No presente estudo das 104 cepas testadas pela técnica de PCR para detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*, relacionados a produção de biofilme em *Staphylococcus* sp., nenhuma cepa foi positiva para o gene *icaC*. Quanto as cepas CoPS, 53% (31/58) foram positivas para o gene *icaA* isoladamente, 5% (3/58) apresentaram somente o gene *icaD* e 27% (16/58) apresentaram ambos os genes *icaA* e *icaD*, sendo a maioria dos portadores destes genes o *S. aureus* (Tabela 4).

Em relação aos CoNS 100% das amostras foram positivas para o gene *icaA* e 9% (4/46) apresentaram, simultaneamente, os genes *icaA* e *icaD*.

No geral 64% (67/104) cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas para a formação de biofilme em CRA e destas 7% (5/67) foram negativas para os genes do complexo *ica* testados.

4.4 Discussão

O gênero *Staphylococcus* spp. está subdividido em 40 espécies, que se dividem em dois grupos (CoPS e CoNS) de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase. Os CoPS compreendem *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*, sendo a maiorai CoNS (QUINN et al., 2005). *S. aureus* é a espécie de maior interesse para a microbiologia de alimentos por provocar intoxicações de origem alimentar frequentes em nosso meio (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Neste estudo das 104 cepas, oriundas do leite e de seus respectivos queijos Artesanal Serrano, utilizadas neste estudo 56% (28/104) eram CoPS e 44% (46/104) eram CoNS e observou-se uma predominância de *S. aureus* (63,79%) em relação aos demais CoPS. Todos as cepas identificadas como *S. aureus* apresentaram o gene *femA*. O gene *femA* é amplamente utilizado para identificação molecular de *S. aureus*, por ser específico para esta espécie (BOEREMA et al., 2006). Corroborando com este estudo Rosengren et al. (2010) encontraram 69% das amostras produzidas com leite cru e 6% das amostras fabricadas com leite pasteurizado contaminadas por CoPS em seu estudo com amostras de queijos na Suécia. Semelhante ao encontrado aqui, Senger e Bizani (2011) em sua pesquisa com 60 amostras de queijo Minas Frescal (30 produzidos artesanalmente e 30 produzidos industrialmente) comercializado na cidade de Canoas, RS, 40% e 23,3% das amostras do queijo artesanal e industrial respectivamente, apresentaram-se contaminadas com *S. aureus*.

A presença de *Staphylococcus*, incluindo CoPs e CoNS, enterotoxigênicos em alimentos constitui um problema sanitário, uma vez que, podem causar intoxicações de origem alimentar nos consumidores. No presente trabalho, das 58 cepas de CoPS nove (15%) foram positivas para algum dos cinco genes de enterotoxinas pesquisados. Sendo que nove cepas eram oriundas do leite e apenas uma do queijo

Artesanal Serrano. Oito (40%) apresentaram o gene *seb* e uma cepa oriunda do queijo foi positiva para gene *sea*. Este fato sugere que os *Staphylococcus* sp. isolados do queijo e do leite sejam de origem diferente e neste trabalho as cepas oriundas do leite demonstraram-se com maior potencial enterotoxigênico. A principal fonte de *S. aureus* para derivados lácteos é a matéria-prima contaminada, visto que micro-organismos desta espécie estão entre os agentes etiológicos da mastite bovina (OLIVEIRA et al., 2007). Outra importante fonte contaminação do alimento por este micro-organismo é o manipulador, devido a capacidade de serem reservatórios naturais dessa bactéria. André et al, (2008) em seu trabalho encontraram que de um total de 140 funcionários de uma unidade de produção de leite e derivados, 75% apresentaram *S. aureus* em suas mãos.

As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes a inativação por proteases estomacais, como a pepsina, e são termoresistentes. Portanto, podem ser encontradas no alimento, mesmo na ausência do micro-organismo e são nomeadas com letras alfabéticas de acordo com a ordem em que foram descobertas, as enterotoxinas clássicas são classificadas de SEA a SEE (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Corroborando os resultados encontrados nesta pesquisa, Borelli et al. (2011), não detectaram os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de Queijo Minas produzidos com leite cru. Semelhantemente, Gucukoglu et al. (2012) encontraram 13,7% (7/51) de cepas de *S. aureus*, provenientes de leite cru, positivas para os genes *sea* e *seb*. Hunt et al. (2012), demonstraram que 83,2% das cepas isoladas de leite cru e de queijos relacionados não continham os genes codificadores de enterotoxinas pesquisados. Rosec e Gigaud (2002), também encontraram baixa incidência de genes de enterotoxinas (9/74) em seu estudo com *Staphylococcus* sp. Diferindo desta pesquisa Holecková et al. (2002), relataram em sua pesquisa uma alta taxa (47,4%) de *Staphylococcus* enterotoxigênicos isolados de queijos produzidos com leite de cabra na Eslováquia, com prevalência para *seb* (36,8%), seguido por *sea* (5,3%) e *sea + seb* (5,3%).

São necessárias algumas condições para produção de enterotoxinas no alimento como, cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* sp. necessitam estar presente, o alimento deve ser um substrato para o crescimento bacteriano e tempo e temperatura apropriados para a produção da toxina. Além disso, a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) podem interferir na síntese de enterotoxinas

estafilocócicas através da acidificação do meio, produção de bacteriocinas, produção de peróxido de hidrogênio e competição nutricional (NOVICK, 2003). Isso pode explicar a baixa incidência de bactérias portadoras de genes que codificam enterotoxinas, principalmente no queijo devido a acidificação do meio, gerada pela multiplicação das bactérias ácido lácticas.

Embora a presença de genes codificadores não signifiquem, necessariamente, a presença da toxina, demonstram o potencial da bactéria em produzir enterotoxinas quando em condições adequadas no alimento.

Outro fator importante relacionado aos *Staphylococcus* sp. é quanto ao potencial de formação de biofilme. Biofilmes são microrganismos aderidos uma superfície e envoltos por uma matriz polimérica de síntese própria, constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominados em conjunto de exopolissacarídeos (EPS). A matriz proteica de biofilmes formados por *Staphylococcus* sp. é composta de poli-N-acetil-glicosamina (PIA) (SAUER et al., 2007).

A formação de biofilme em superfícies e equipamentos constitui um dos principais problemas para o setor de leite e derivados, por representar uma fonte de contaminação de produtos lácteos por bactérias patogênicas, conferindo assim, riscos à saúde do consumidor (OLIVEIRA et al., 2010). Além do mais, as bactérias de um biofilme são mais resistentes a antimicrobianos, do que em sua forma planctônica (RAZA et al., 2013).

No presente estudo 71% (41/58) das cepas CoPS e 56% (26/46) CoNS foram positivos para formação de biofilme em CRA. No geral 64% cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas no CRA e destas 7% (5/67) foram negativas para os genes *icaA*, *icaD* e *icaC* testados. Evidenciando que nestes casos outros fatores possam estar envolvidos na formação do biofilme, e que possivelmente estas cepas sejam *ica*-independentes. Em algumas cepas de *S. aureus* a expressão de biofilme ocorre independente a expressão do operon *icaABCD*, pois a produção de uma ampla variedade de proteínas de adesão permite o estabelecimento do biofilme (LASA e PENADÉS, 2006).

Semelhantemente, Darwish et al. (2013) e Melo (2011) detectaram que 70,4% e 79,4% dos isolados de leite bovino foram produtores de biofilme em CRA, respectivamente. Jain e Agarwal (2009) verificaram que a produção de biofilmes foi de 74% e 32% para as estirpes patogênicas e não patogênicas de estafilococos,

respectivamente. Observaram também que o teste do Ágar Vermelho Congo demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 90% para os *S.aureus*.

Quanto as cepas CoPS, 53% (31/58) foram positivas para o gene *icaA* isoladamente, 5% (3/58) apresentaram somente o gene *icaD* e 27% (16/58) apresentaram ambos os genes *icaA* e *icaD*. Sendo a maioria delas *S. aureus*, evidenciando a importância desta espécie em relação as demais, no entanto, a presença dos genes em outras espécies de CoPS e CoNS evidenciam o potencial de virulência destas cepas, não devendo ser elas subestimadas.

Em relação aos CoNS 100% das amostras foram positivas para o gene *icaA* e 9% (4/46) apresentaram, simultaneamente, os genes *icaA* e *icaD*. Com a presença do gene *icaA* isoladamente ocorre reduzida expressão de biofilme, uma vez que esse gene codifica a enzima responsável pela produção do polissacarídeo PIA em pequenas quantidades. No entanto, com a presença concomitante de *icaD*, há um considerável aumento na sua produção, potencializando a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* (MARTIN, 2015).

Com base nesta informação, 27% dos CoPS possuem potencial considerável para formação de biofilme, em relação aos genes detectados nesta pesquisa. No entanto, a presença de isolados *ica*-positivos em ambas as origens (leite e queijo) sugere uma ampla distribuição de *Staphylococcus* sp. potencialmente produtores de biofilmes. Destacando a necessidade de seguir rigorosamente as normas de higienização e sanitização das queijarias, a fim de impedir a aderência da bactéria as superfícies e consequentemente a formação do biofilme.

Giardini (2013) demonstrou em seus estudos que dos 132 isolados de *S. aureus* testados para os genes *icaA* e *icaD*, apenas (27,3%) apresentaram um ou ambos os genes, o gene *icaD* foi o mais prevalente em (14,4%), seguido pela presença de ambos os genes (8,3%), enquanto *icaA* foi o gene menos prevalente (4,5%). Resultados estes que diferiram daqueles encontrados neste estudo, onde gene mais prevalente foi o *icaA*, tanto para CoPS (52%), quanto para CoNS (91%). Em sua pesquisa Santos (2009) encontrou que 15 (36,6%) das 41 cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas para o gene *icaA* e 100% positivas para o gene *icaD*.

No geral nesta pesquisa, 64,42% (67/104) cepas de *Staphylococcus* sp. foram positivas para formação de biofilme em CRA e destas 8,95% (6/67) foram negativas para os genes *icaA*, *icaD* e *icaC* testados. Isso explica o fato de ter sido encontrado

amostras positivas no CRA e no entanto negativas para os genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, indicando que possivelmente outros fatores estão envolvidos na formação do biofilme

A importância o operon *icaABCD* para a formação da PIA e consequente formação de biofilme já é estabelecida. Porém, em algumas cepas de *S. aureus* a expressão de biofilme ocorre independente da expressão deste operon, pois a produção de uma ampla variedade de proteínas de adesão permite o estabelecimento do biofilme (LASA e PENADÉS, 2006).

4.5 CONCLUSÃO

A presença de genes codificadores de enterotoxinas, mesmo que em baixa quantidade, evidencia o potencial enterotoxigênico dos CoPS, fato este de imensa importância para saúde pública pela capacidade destas cepas ocasionarem algum dano a saúde consumidor.

O potencial da maioria dos isolados utilizados no estudo para formar biofilme é um fator preocupante, principalmente, por estas cepas serem oriundas de leite e queijo. Fica claro aqui a necessidade das queijarias em seguir rigorosamente os processos de autocontrole, a fim de, assegurar um produto inócuo para o consumidor.

É indubitável a importância da identificação do potencial dos CoNS para indústria alimentícia. Espera-se assim, que esta pesquisa possa servir de subsídio para que a legislação vigente contemple também, uma quantidade mínima permitida de CoNS em alimentos.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison os *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine Milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 200-207, 2008

ARCHER, N. K; MAZAITIS, M. J; COSTERTON, J. W; LEID, J. G; POWERS, M. E; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
DOI:10.4161/viru.2.5.17724

ARCIOLA, C. R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **Journal of biomedical Materials Research Part A**, v. 75A, n. 2, 2005. DOI:10.1002/jbm.a.30445

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning na *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010. ISSN 2072-6651.

BANNOEHR J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v.23, n.4, p. 253-66, 2012/ DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x

BOEREMA, J. A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. "Evaluation of Molecular Methods to Determine Enterotoxigenic Status and Molecular Genotype of Bovine, Ovine, Human and Food Isolates of *Staphylococcus aureus*," **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 107, No. 2, 2006, pp. 192-201.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p. 481-487, 2011. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – Junho, 2017.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-9, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREEMAN, D. J.; F R FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados do queijo minas frescal**. 2005. 106p. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2005.

GIARDINI, L. K. **Identificação de grupos clonais, resistência aos antimicrobianos e presença de genes associados à formação de biofilmes (*icaA* e *icaD*) em *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino**. 2013. 92p. Tese (Doutor em Ciência Veterinária) – Universidade

Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina Veterinária – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária. Porto Alegre-Rio Grande do Sul 2013.

GÜCÜKOGLU, A.; KEVENK, T. O.; UYANIK, T.; CADIRCI, O.; TERZI, G.; ALISARLI, M. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, 2012. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02954.x

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINÁCOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 179-182, 2002.

HUNT, K.; SCHELIN, J.; RÅDSTRÖM, P.; BUTLER, F.; JORDAN, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 5, p. 487-499, 2012. DOI:10.1007/s13594-012-0067-4

JAIN, A.; AGARWAL, A.; Biofilm Production, a Marker of Pathogenic Potential of Colonizing and Commensal Staphylococci,” **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 1, p. 88-92, 2009. doi:10.1016/j.mimet.2008.09.017

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.669>.

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99-107, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

MARTIN, J. G. P. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas Frescal. 2015. 102p. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura e “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2015.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; THALER NETO, A.; KNACKFUSS VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Avaliação da inocuidade e qualidade do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 41, n. 1152, p. 1 – 7, 2013. ISSN 1679-9216.

MELO, P. C. **Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina.** 2011. 139p. Tese (Doutor em Medicina Veterinária-Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2011.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1429-1449, 2003. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Time course of biofilm formation by and mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-13, 2007. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.016.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência Tecnologia Alimentares**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.

PONTAROLO, G. H.; MELO, F. D.; MARTINI, C. L.; WILDEMANN, P.; ALESSIO, D. R. M.; SFACIOTTE, R. A. P.; THALER NETO, A.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Qualidade e inocuidade de queijos artesanais produzidos na região serrana em Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 739-748, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n2p739.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Aramed, 2005.

RAZA, A.; MUHAMMAD, G.; SHARIF, S.; ATTA, A. Biofilm Producing *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis: A Review. **Molecular Microbiology Research**, v.3, n.1, p. 1-8, 2013. ISSN 1927-5595.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1–2, p. 61-70, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00044-2).

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 263 – 269, 2010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrefilm rsa® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001. ISSN 1678-457X

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 57f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” - FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS. Jaboticabal –São Paulo. 2009

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25 – 42, 2011 / ISSN 1981-8858.

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

VALLE, J.; GOMEZ, L. E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; VADILLOI, S. Enterotoxin Production by Staphylococci Isolated from Healthy Goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, 1990.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C.; The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998

5 ARTIGO 2

Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from artisanal cheese in Santa Catarina, Brazil

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the main representative of *Staphylococcus* coagulase positive (CoPS) and is the most frequent associated with food poisoning because of its capacity to produce extracellular toxins and antimicrobial resistance. However, coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) also have the ability to produce these virulence factors. Among the foods frequently associated with outbreaks of staphylococcal intoxication are milk and cheese. This work aimed to identify *Staphylococcus* coagulase positive, the phenotypical characterization of antimicrobial resistance profile and molecularly detect the presence of resistance genes to beta-lactam drugs (*mecA*, *mecC* and *blaZ*) in strains of *Staphylococcus* sp. For this study a total of 58 strains of *Staphylococcus* coagulase positive and 45 *Staphylococcus* coagulase negative from milk and their respective Artisanal Serrano cheeses from Santa Catarina (SC) were used. In a total of 58 CoPS 37 (64%) were identified with *Staphylococcus aureus*, being the most prevalent. For the detection of the resistance profile 103 strains were submitted to the antimicrobial susceptibility test, in which higher levels of resistance were observed against PEN (41% CoPS) and (31% CoNS), AMO (40% CoPS), AMP (36% CoPS) and SUT (35% CoNS). Twenty seven (26%) strains (18 CoPS and 9 CoNS) demonstrated a multiresistance profile, being resistant to at least three different classes of antimicrobials tested. PCR multiplex technique was used to search the *mecA*, *mecC* and *blaZ* genes. Twelve strains (9 CoPS and 3 CoNS) were positive for *mecA* and 10 strains (4 CoPS and CoNS) positive for *blaZ*. The high prevalence of *Staphylococcus aureus*, the presence of resistant and multiresistant strains and the antimicrobial resistance genes, emphasize the need for greater hygiene care and good product manufacturing practices. These results highlight the risk to veterinary clinic and public health since these resistance genes can be transferred to man and / or animals, making it difficult or even impossible to treat potentially curable diseases.

Key words: coagulase positive *Staphylococcus*, coagulase negative *Staphylococcus*, *mecA* e *blaZ*

5.1 Introduction

The Artisanal Cheese is a product widely distributed in the mountain region of Santa Catarina State and its main characteristic is to be produced from raw milk. Small cattle producers make the cheese and many of them still today commercialize their products informally. In other words, without undergoing an inspection process that guarantees the quality and safety of the product to consumers (IDE and BENEDETI, 2001; MELO et al., 2013). In addition, studies have demonstrated the isolation of *Staphylococcus aureus* above 10³ UFC/g, maximum value allowed by current legislation (MELO et al., 2013).

Food safety is a concern for consumers and public health, since products available for commercialization may pose a health risk if hygienic-sanitary care during the production process is not strictly followed (GUIMARÃES, 2012). Among foods frequently associated with outbreaks of staphylococcal infections are mainly milk and dairy products. Cheese contamination by *Sthaphylococcus* sp. can occur due to a poor quality of raw material, also from the manipulator or failures in good manufacturing practices (SILVA et al., 2010).

The genus *Staphylococcus* is subdivided into two large groups, coagulase-positive staphylococci (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS) (KONEMAN et al., 2006). CoNS are frequently isolated from human and animal clinical samples, but their importance isrelated to epidemiological data and suspicion of resistance to glycopeptides (TEIXEIRA, 2009). In addition, studies have demonstrated its presence associated with outbreaks of food poisoning (ANDRADE et al., 2011). Among CoPS, *S. aureus* is the species of greatest interest because they are highly biologically active, besides, producing several toxins (SILVA et al., 2010).

Another important factor that has been observed in *Staphylococcus* is the emergence of resistant strains and/or multiresistant antimicrobial agents (FLEMING et al., 2010). Resistance to beta-lactams has been associated mainly with two mechanisms. The first mechanism is the production of an extracellular β-lactamase enzyme, encoded by the *blaZ* gene. The second is the production of a low affinity penicillin protein (PBP2a) which is encoded by the *mecA* gene (LOWY, 2003). The *mecC* gene was found in bovine *S. aureus* strains and subsequently in human *S.*

aureus, presenting about 70% of nucleotides homologous to *mecA*, however, little is known about its functionality (PICHON et al., 2012).

Bacteria present in food, once in the gastrointestinal tract, can transfer genes that confer antimicrobial resistance to other bacteria of the species itself or unrelated species, pathogenic or not. Therefore, the presence of resistant and/or multiresistant bacteria in foods of animal origin is an extremely important factor when it comes to public health (RAPINI et al., 2004).

This work aimed to identify the *Staphylococcus* coagulase positive, phenotypically characterize the antimicrobial resistance profile and detect the presence of resistance genes to beta-lactam drugs in strains of *Staphylococcus* spp., isolated from milk and their respective artisanal cheeses produced and commercialized in the mountain region of Santa Catarina State.

5.2 Material and methods

For this study, 58 isolates of *Staphylococcus* coagulase positive and 45 isolates of *Staphylococcus* coagulase negative, totaling 103 bacterial samples, isolated from milk (33 isolates) and their respective artisanal cheeses (70 isolates), produced in the mountainous region of Santa Catarina. Samples were maintained at - 20°C in BHI broth (Brain heart infusion broth) with 20% glycerol. The samples were recovered and purified in BHI agar and incubated in a bacteriological incubator for 24 hours at 37°C.

For the phenotypic characterization of CoPS, the coagulase, Vogues-Proskauer, urease, resistance to polymyxin B and fermentation of mannitol, trehalose and sucrose tests were used (QUINN et al., 2005; BANNOEHR, GUARDABASSI, 2012).

The phenotypic characterization of the resistance was performed by the disk diffusion technique in Müller Hinton Agar, the strain *S.s aueus* ATCC 25923 was used as a control. The antimicrobials tested were: Penicillin G 10 U (PEN), amoxicillin 10 µg (AMO), ampicillin 10 µg (AMP), ampicillin/ sulbactam 20 µg (ASB), amoxicillin/ clavulanic acid 20/10 µg (AMC), cephalothin 30 µg (CFL), cephalexin 30 µg (CFX), ceftriaxone 30 µg (CRO), ceftiofur 30 µg (CTF), imipenem 10 µg (IMP), meropenem 10 µg (MER), amikacin 30 µg (AMI), neomycin 30 µg (NEO), streptomycin 10 µg (EST), tobramycin 10 µg (TOB), gentamicin 10 µg (GEN),

enrofloxacin 05 µg (ENO), norfloxacin 10 µg (NOR), ciprofloxacin 5 µg (CIP), levofloxacin 5 µg (LEV), azithromycin 15 µg (AZI), erythromycin 15 µg (ERI), clindamycin 02 µg (CLI), doxycycline 30 µg (DOX), tetracycline 30 µg (TET), rifampicin 05 µg (RIF) and sulfamethoxazole/trimethoprim 1.25/23.75 µg (SUT). After incubation, the inhibition zone diameter (mm) was measured and the samples were classified as resistant (R), susceptible (S) or intermediate (I), according to CLSI (2015).

For the extraction of bacterial DNA was used the technique standardized by the Laboratory of Animal Microbiology of the Regional Campus of Umuarama (CAU), State University of Maringá (UEM), chloroform/ alcohol-isoamylic extraction (CIA). Two-hundred µL of the inoculum was added to 500 µL of CIA (24:1), incubated for 30 min. at 56°C. After, it was centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was transferred to a new sterile microtube, 600 µl of cold 70% alcohol was added and centrifuged at 13,500 rpm for 20 min. After, the supernatant was discarded and the microtube was placed in the incubator at 56°C for complete drying. The DNA was suspended in sterile ultrapure water, homogenized and stored at -20°C (NAKADOMARI et al., 2017).

For beta-lactam resistance genes were detected using a PCR technique, developed at the Laboratory of Animal Microbiology of the Agroveterinary Sciences Center (CAV), Campus de Lages, State University of Santa Catarina (UDESC) (data not published). The reactions were carried out using 25 µl of final volume, 2 µl of extracted DNA, 0.4 pmol of each primer (Table 1), 200 mM of each dNTP, 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 0.25 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®). The conditions were described below: initial denaturation at 95°C/ 5 min., 40 cycles of 95°C/1 min., 54°C/1 min. and 72°C/1 min. and final extension at 72°C/7 min. The *S. aureus* strain ATCC 43300 was used as a positive control for the reaction.

Table 5: Primers used for the detection of beta-lactam antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus* spp.

Primer	Sequence 5' - 3'	Amplification	Reference
<i>mecA</i>	F -GAT GAT ACC TTC GTT CCA R -GTA TGT GCG ATT GTA TTG	316 pb	SFACIOTTE et al., 2015
<i>mecC</i>	F -GAT TTA AAG TAG TAG ACG GC R -TTT CAC CGA TTC CCA AAT CT	138 pb	PICHON et al.; 2012
<i>blaZ</i>	F -AGA GAT TTG CCT ATG CTT R -CTT GAC CAC TTT TAT CAG C	516 pb	ASFOUR e DARWISH, 2011 (modificado)
16S	F -AGG TGG CAA GCG TTA TCC R -CGC ACA TCA GCG TCA G	228 pb	ASFOUR e DARWISH, 2011 (modificado)

5.3 Results

In the present study, a total of 58 CoPS samples were tested, 37 (64%) were *S. aureus*, 13 (22%) *S. scheiferi* subsp. *coagulans*, 7 (14%) *S. hyicus* and 1 (2%) *S. intermedius*.

Table 2 shows the results of antimicrobial susceptibility tests in this study. The highest resistance rates were obtained with penicillin (41% CoPS and 31% CoNS), amoxicillin (40% CoPS), ampicillin (36% CoPS) and sulfonamides + trimethoprim (35% CoNS) these antimicrobials are frequently used in the management of cows with mastitis.

However, 14 CoPS isolates (24%) and 7 CoNS isolates (15%) were sensitive to all antimicrobials tested. The test demonstrated the high susceptibility (> 90%) of both CoPS and CoNS against ampicillin + sulbactam, imipenem, meropenem, neomycin, tobramycin, gentamicin, norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin and doxycycline. The CoPS were still sensitive (> 90%) to enrofloxacin and sulfonamides + trimethoprim.

Forty-four (76%) CoPS isolates were resistant to at least one class of antimicrobial tested and of these 18 (31%) demonstrated a multiresistance profile being resistant to at least three different classes. Similar behavior was observed with the CoPN isolates where, 38 isolates (84%) were resistant to at least one class of antimicrobial tested, of which 9 (20%) were multiresistant.

Table 6: Resistance profile of CoPS and CoPN isolates isolated from milk and artisanal cheese from Santa Catarina.

Antimicrobials	CoPS(58)		CoNS(45)	
	R/I	S	R/I	S
PEN	41,38%	58,62%	31,11%	68,89%
AMO	39,66%	60,34%	24,44%	75,56%
AMP	36,21%	63,79%	17,78%	82,22%
ASB	8,62%	91,38%	0,00%	100,00%
AMC	15,52%	84,48%	0,00%	100,00%
CFL	20,69%	79,31%	0,00%	100,00%
CFX	17,24%	82,76%	6,67%	93,33%
CRO	12,07%	87,93%	11,11%	88,89%
CTF	13,79%	86,21%	2,22%	97,78%
IMP	1,72%	98,28%	0,00%	100,00%
MER	3,45%	96,55%	0,00%	100,00%
AMI	13,79%	86,21%	2,22%	97,78%
NEO	6,90%	93,10%	0,00%	100,00%
EST	20,69%	79,31%	2,22%	97,78%
TOB	6,90%	93,10%	4,44%	95,56%
GEN	6,90%	93,10%	0,00%	100,00%
ENRO	8,62%	91,38%	20,00%	80,00%
NOR	8,62%	91,38%	6,67%	93,33%
CIP	1,72%	98,28%	0,00%	100,00%
LEVO	3,45%	96,55%	4,44%	95,56%
AZI	12,07%	87,93%	6,67%	93,33%
ERI	25,86%	74,14%	2,22%	97,78%
CLI	22,41%	77,59%	4,44%	95,56%
DOX	1,72%	98,28%	2,22%	97,78%
TET	13,79%	86,21%	13,33%	86,67%
RIF	10,34%	89,66%	8,89%	91,11%
SUT	8,62%	91,38%	35,56%	64,44%

Regarding the molecular characterization for the presence of beta-lactam resistance genes, in a total of 58 CoPS isolates, 9 (15%) were positive for *mecA* and 4 (7%) positive for *blaZ*, whereas the 45 CoNS, 3 (7%) and 6 (13%) presented *mecA* and *blaZ* genes, respectively. Both CoPS and CoNS isolates showed absence of *mecC*, gene (Table 3).

Tabela 7: Percentage of detection of *mecA*, *mecC* and *blaZ* genes of CoPS and CoNS isolated from milk and Artisanal Cheese from Santa Catarina.

Genes	CoPS (58)		CoNS (45)	
	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>MecA</i>	15%	84%	7%	93%
<i>MecC</i>	0	0	0	0
<i>BlaZ</i>	7%	93%	13%	87%

It is important to emphasize that all the results found in this study were uniformly distributed in both bacterial strains, milk and cheese, not highlighting one source as the most important.

5.4 Discussion

Among the CoPS group, *S. aureus* is the species of greatest interest for food microbiology because it causes frequent food poisoning, especially during hot seasons of the year (FRANCO; LANDGRAF, 2008). In this study, 64% of CoPS were identified as *S. aureus*. Rosengren et al. (2010) in a similar study with cheese samples in Sweden, found 69% of the samples produced with raw milk and 6% made with pasteurized milk contaminated by CoPS. Senger and Bizani (2011) evaluated 60 samples of Minas Frescal cheese (30 artisanal and 30 industrially produced) commercialized in the city of Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil, 40% and 23.3% of the artisanal and industrial cheese samples, respectively, were contaminated with *S. aureus*.

The indiscriminate and often unsystematic use of antimicrobials has triggered some problems, such as the emergence of bacterial resistance to drugs (GUIMARÃES, 2012). The development of resistant strains is a natural phenomenon that occurs when microorganisms are exposed to antimicrobial drugs. It is an intrinsic feature of the microorganism to ensure its survival in environments unfavorable to its development (UMBER; BENDER, 2009). This resistance can be carried by the bacterial chromosome or plasmid (RAPINI, 2004). The importance of the antimicrobial susceptibility test for the veterinary clinic and public health is shown here.

The present study demonstrated that the higher resistance rates were achieved against penicillin, where 41% and 31% of CoPS and CoNS strains were resistant, respectively. These results are comparable to those of other researchers

(ROLA et al., 2016; NORMANNO et al., 2007) that found a similar penicillin resistance profile in their studies. Peresi et al. (2006) found a resistance rate of 56% in food isolates involved in outbreaks of food-borne bacterial diseases in the northwest region of São Paulo.

Resistance to penicillin remains the most common as it has also been reported in other studies (Jamile et al., 2015). According to Daka et al. (2012) and Xu et al., (2014) the prevalence of beta-lactam resistance is frequent in *S. aureus* isolated from milk and its derivatives. Several mechanisms are involved in resistance to beta-lactams such as the production of penicillinase that is encoded by the *blaZ* gene and alteration in the penicillin-binding target protein encoded by the *mecA* gene (SFACIOTTE et al., 2015).

The second highest resistance rates was against sulfa + trimethoprim (35.56%) in the CoNS isolates, a similar result was found by Freitas (2005) regarding the resistance profile of *Staphylococcus* coagulase positive isolated from milk of cows with mastitis in the Agreste of Pernambuco and Rapini et al., (2004) with 26.7% resistance to this antimicrobial in strains of *Staphylococcus* sp. isolated from rennet cheese. Differing from the present study with results lower than the one found here, Peresi et al. (2006) reported a percentage of resistance of 4% in relation to sulfa + trimethoprim.

This resistance to sulfa + trimethoprim may be due to its massive use in the treatment of dairy cows with mastitis in the region. This fact demonstrates the necessity and importance of carrying out laboratory tests such as antimicrobial susceptibility testing before prescription and indiscriminate use, seeking the prevention of the emergence and dissemination of resistant and multi-resistant microorganisms.

The results found are alarming, since multiresistance was detected in both CoPS (31%) and in the CoNS (20%). The results found in the present study agree with the literature where a significant increase in antimicrobial resistance is observed, in bacteria isolated from food, contributing to the failure of antimicrobial therapy turning common infections in severe cases.

Fleming et al. (2010) found two CoPS samples with a multiresistance profile isolated from cheeses commercialized in Rio de Janeiro, below than found in the present study. Corroborating with the results of this research Freitas et al., (2005)

and Martins et al., (2009) found a high percentage of multiresistance, 60% and 76%, respectively, in their studies with strains of *S. aureus*.

In relation to the genotypic analysis for beta-lactam resistance genes, (15%) CoPS and (7%) CoNS were positive for the *mecA* gene and (7%) CoPS and (13%) CoNS were positive for the *blaZ* gene. These data justify the fact that the highest resistance index found in this study was against beta-lactam antibiotics. Diniz et al. (2010) obtained a result superior to that found here, with 33.78% of the isolates of *Staphylococcus* sp. presented the *mecA* gene. Lee et al., (2004) found 3.56% positive strains for the same gene in studies with animal samples. Ammar et al. (2016) detected the presence of the *mecA* and *blaZ* genes in their study with strains of *S. aureus* isolated from milk and meat products in Egypt.

In the other hand, Silveira-Filho et al. (2014) did not find the *mecA* gene in their research on isolated strains of milk and derivatives in Brazilian Northeast region. The presence of bacteria with antimicrobial resistance genes in food concerns because in the gastrointestinal tract of man, they may transfer their antimicrobial resistance genes to other bacteria of the species itself or unrelated, pathogenic or non-pathogenic species (RAPINI et al., 2004).

Once cheese is a source of income for many small producers and is also widely consumed in the region, the presence of resistant and multiresistant CoPS and CoNS strains and the presence of resistance genes are extremely worrying factors for veterinary clinics and public health because they make it difficult or even impossible to treat potentially curable diseases. Highlighting the need for a prudent and critical use of antimicrobials used in the treatment of production animals. As well as, more attention to good manufacturing practices, in order to avoid the emergence and dissemination of resistant microorganisms.

5.5 Conclusion

Antimicrobial resistance was detected in both CoPS and CoNS, evidencing the importance of CoNS in the dissemination of this resistance. In this way it is expected that this study can serve as a subsidy so that the current legislation also includes the CoNS with a minimum acceptable value for food.

5.6 References

- AMMAR, A. M.; ATTIA, A. M.; EL-HAMID, A.; EL-SHORBAGY, I. M.; EL-KADER, A. Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 10, p. 7-15, 2016.
- ANDRADE, A.P.C. et al. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho / – Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2011.
- ASFOUR, H.A.E.; DARWISH, S.F. Phenotypic and genotypic detection of both *mecA* and *blaZ* genes mediated β-lactam resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis. **Global Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 39-50, 2011. ISSN1992 – 6197.
- BANNOEHR J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v.23, n.4, p. 253-66, 2012/ DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2015.
- DAKA, D.; G/SILASSIE, S.; YIHDEGO, D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 26, p. 3-6, 2012. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/11/1/26>
- DINIZ, C. M.; MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; COELHO, L. R.; FONSECA, B. B.; ROSSI, D. A. Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 482-488, 2010. ISSN: 0073-9855; e-ISSN: 1983-3814 DOI: 10.14715/cmb/2016.62.10.2
- FLEMING, L. R.; BOLZAN, D. N.; BANDEIRA, S. O.; NASCIMENTO, J. DOS S. QUANTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Staphylococcus* ISOLADOS DE QUEIJOS. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2, n.1/2, p.13-19, 2010.
- FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVOS ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE NO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, abr./jun., 2005. ISSN 1808-1657

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.84, n.5, p.501-506, 2009/ ISSN-e: 18064841

GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. C. V.; AZEVÉDO, P. F.; MENESES, R. B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.2, p.259-265, 2012/ ISSN: 0073-9855 - e-ISSN: 1983-3814.

IDE, L.P.A.; BENEDET H.D. Contribuição ao Conhecimento do Queijo Colonial Produzido na Região Serrana de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Cocos gram positivos: Parte 1. **Estafilococos e microrganismos relacionados** In: **diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido, 5^a ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, p. 619 – 646, 2006.

LEE, J. H.; JEONG, J. M.; PARK, Y. H.; CHOI, S. S.; KIM, Y. H.; CHAE, J. S.; MOON, J. S.; PARK, H.; KIM, S.; EO, S. K. Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2780–2782.2004

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003/ DOI: 10.1172/JCI200318535

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; THALER NETO, A.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Avaliação da inocuidade e qualidade do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 1152, n. 41, p. 1 – 7, 2013. ISSN 1679-9216

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BALLACICCO, A.L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal Food Microbiology**, v. 117, n.2, p. 219–222, 2007. DOI: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C. CARDIGA, E. A.; MARQUES, D. F.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 65, p. 112-117, 2006. ISSN: 0073-9855; e-ISSN: 1983-3814

PICHON, B.; HILL, R.; LAURENT, F.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; HOLMES, M.; EDWARDS, G. F.; TEALE, C.; KEARNS, A. M. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton–Valentine leucocidin (), *mecA* and homologue *mecALGA251*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p. 2338–2341, 2012. doi:10.1093/jac/dks221.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artemed, 2005.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. p.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.130-33, 2004. ISSN 1678-4162.

ROLA, J. G.; CZUBKOWSKA, A.; KORPYSA-DZIRBA, W.; OSEK, J. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. **Toxins**, Switzerland, v. 8, n. 62. P. 1-9, 2016. DOI:10.3390/toxins8030062

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 263 – 269, 2010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25 – 42, 2011. ISSN 1981-8858

SFACIOTTE, R. A. P.; CORONEL, L. G.; OSAKI, S. C.; WOSIACKI, S. R. Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 2693-2712, jul./ago. 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n4p2693

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

SILVEIRA-FILHO, V.; LUZ, I.; CAMPOS, A. P. F.; SILVA, W. M.; BARROS, M. P.; MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; LEAL-BALBINO, T. C. Antibiotic Resistance and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cow's Milk and Dairy Products in Northeast Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 583-591, 2014. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-13-343

TEIXEIRA, C. F. **Estafilococos coagulase-negativa – um risco real para a saúde pública**. 80 f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

UMBER, J. K.; BENDER, J. B. Pets and antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 279-292, 2009.
ISSN: 0195-5616

XU, J.; SHI, C.; SONG, M.; XU, X.; YANG, P.; PAOLI, G.; SHI, X. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Traits of Foodborne *Staphylococcus aureus* Isolates from Shanghai. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 635-642, 2014.
DOI: 10.1111/1750-3841.12405