



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS**

**RENATA AMANDA CARNEIRO AGUIAR**

**POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE  
*STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL DIAMANTE**

**Florianópolis**

**2024**

Renata Amanda Carneiro Aguiar

**POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE  
*STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL DIAMANTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fabienne Antunes Ferreira

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Aguiar, Renata Amanda Carneiro  
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE  
STAPHYLOCOCCUS SP. ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL DIAMANTE /  
Renata Amanda Carneiro Aguiar ; orientador, Juliano De Dea  
Lindner, coorientadora, Fabienne Antunes Ferreira , 2024.  
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Avaliação microbiológica e  
segurança dos alimentos . 3. Staphylococcus aureus e resistência  
a antibióticos. 4. Intoxicação alimentar. 5. Abordagens  
moleculares. I. Lindner, Juliano De Dea . II. Ferreira ,  
Fabienne Antunes. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Renata Amanda Carneiro Aguiar

**POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE  
*STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL DIAMANTE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em: 15/12/2023, por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

Departamento de Alimentação e Nutrição Experimental – Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UFSC)

Prof<sup>a</sup>.Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Itaciara Larroza Nunes

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner

Orientador

Florianópolis, 2024.

“Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,  
Maria Silene Carneiro e Luiz Carlos Gomes  
Aguiar, por todo o amor incondicional e por  
serem minha maior fonte de inspiração. Com  
todo o meu amor e gratidão, amo vocês”!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por guiar os meus passos e iluminar meu caminho durante todo esse percurso desafiador. Sua graça e amor foram minha bússola constante. Agradeço a toda a minha família, especialmente aos meus queridos pais, Luiz Carlos e Maria Silene, o amor, apoio incondicional e encorajamento foram a base sólida que me permitiu alçar voos mais altos. Ao meu irmão Carlos Halyson, a minha tia Fransquinha adeodato, carinhosamente chamada de Inha, por dedicar tempo precioso ao meu aprendizado na leitura e escrita durante minha infância. Agradeço também a minha tia Maria do Socorro por seu apoio e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Aos meus avôs, Raimundo Nonato Aguiar (Patrãozinho) e José Adeodato Carneiro (Zé Patriarca), e à minha tia Izabel Luiza, que não estão mais aqui na terra, mas cujas lembranças permanecem vivas no meu coração, presto minha sincera homenagem a vocês.

Agradeço a Pedro Cajazeiras, Iete Cajzeiras e Renato Cajazeiras pelo apoio e carinho constante em minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Juliano De Dea Lindner, expresso minha profunda gratidão pela orientação, sabedoria compartilhada e por tornar possível a realização desse sonho. Suas lições não apenas enriqueceram a minha mente, mas também foram fontes de inspiração para meu coração, obrigada por ser um professor excepcional.

A minha co-orientadora, professora Dra. Fabienne Antunes Ferreira, pela maneira como moldou meu pensamento acadêmico, através da sua orientação, dedicação e seu comprometimento com a excelência, sou grata por te-lâ como referência nesta jornada.

Aos membros da Banca Examinadora pela dedicação e valiosas sugestões que enriqueceram este trabalho, minha sincera gratidão.

A professora Dra. Nathália Cristina Cirone Silva, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela valiosa parceria e significativa contribuição para esta pesquisa. Agradeço a Dra. Larissa Alvarenga Batista Botelho do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Breno, meu amado namorado, sua paciência, apoio inabalável e amor foram a âncora que me sustentou nos momentos mais difíceis. Agradeço por ser minha fonte de

inspiração e por compartilhar essa jornada ao meu lado. Sua presença iluminou meus dias, e sua dedicação aqueceu meu coração, amo você além das palavras.

Ao meu amigo professor Dr. Rinaldo dos Santos Araújo, você que foi um dos principais incentivadores durante meu doutorado, minha sincera gratidão por acreditar no meu potencial. A jornada do doutorado foi árdua, mas sua presença fez toda a diferença. O sucesso desta jornada também é seu. Agradeço também a Jackson Sena do Laboratório de Tecnologia de Química do IFCE Campus de Fortaleza.

Agradeço ao Professor Júlio Otávio Portela pelo apoio durante o processo de decisão de iniciar esta jornada do doutorado. Suas palavras, quando afirmava que 'esse mundo não tem porteiros', eram um incentivo para buscar os meus sonhos com determinação.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente Ivan de Marco meu irmão do coração, Camila Rocha, Marcel Provenzi, Gabriel Fernandez, Neyeli Cristine, Clarissa Aquino, Rosemeire Zuccareli que estiveram ao meu lado, compartilhando risos nos momentos leves e oferecendo ombros nos desafios, juntos, enfrentamos obstáculos e celebramos conquistas, vocês são especiais no meu coração. Agradeço também a Beatriz Figueiredo e Luiza Schmidt do Laboratório de Protozoologia pela colaboração.

Agradeço aos Laboratórios de Genética Molecular Bacteriana (GEMBAC), Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências biológicas da UFSC. Agradeço também ao Laboratório de Análises (LABCAL) no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC e Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de pesquisa concedida no doutorado, À FAPESC pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e a Universidade Federal de Santa Catarina.

Este é um capítulo que encerro com amor e gratidão no coração.

## RESUMO

A tendência dos consumidores por produtos naturais ou pouco processados tem impulsionado o consumo de queijos artesanais elaborados com leite cru. O desenvolvimento das características sensoriais nesses queijos provém da comunidade microbiana naturalmente presente no leite, também responsável pelo controle do crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Contudo, a associação de surtos de doenças transmitidas por alimentos ao consumo de leite cru e seus derivados levanta preocupações sobre a segurança microbiológica e consumo desses queijos. Entre os patógenos frequentemente isolados de leite cru e seus produtos derivados, destaca-se o gênero *Staphylococcus* sp. A ingestão de leite cru ou queijos artesanais contaminados por cepas de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pode resultar em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Adicionalmente, cepas enterotoxigênicas podem apresentar perfis de resistência a antibióticos, incluindo *mecA*, conferindo resistência à meticilina. Este estudo objetivou caracterizar molecularmente *S. aureus*, avaliar o perfil de resistência antimicrobiana e potencial enterotoxigênico de cepas isoladas de amostras de queijo artesanal colonial Diamante, além de identificar a diversidade bacteriana nos queijos através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram identificados 57 isolados de *S. aureus*, destacando-se a resistência à penicilina (33,33%), seguida pela clindamicina (28,07%), eritromicina (26,31%) e tetraciclina (22,80%). As cepas testadas também demonstraram resistência induzível à clindamicina, incluindo nove isolados multirresistentes. Embora não tenham sido detectadas enterotoxinas e/ou seus genes produtores nas amostras e nos isolados, respectivamente, o gene codificante da toxina Leucocidina Pantón-Valentine (*lukF-lukS*) foi encontrado em 38,9% dos isolados. O tipo *agr* I foi o mais prevalente (61,90%), seguido pelo tipo II (23,81%), com dez tipos de *spa* types identificados (t1451, t002, t189, t2734, t105, t518, t17308, t11712, t127, t521). O perfil metataxômico revelou a presença de 68 espécies distintas nas amostras de queijos. A compreensão da diversidade microbiana é fundamental para o gerenciamento da qualidade de queijos elaborados a partir de leite cru.

**Palavras-chave:** Caracterização molecular, resistência antimicrobiana, intoxicação alimentar, análise metataxômica.

## ABSTRACT

The consumer trend for natural or less processed products has driven the consumption of artisanal cheeses made with raw milk. The development of sensory characteristics in these cheeses comes from the microbial community naturally present in the milk, which is also responsible for controlling the growth of potentially pathogenic bacteria. However, the association of foodborne illness outbreaks with the consumption of raw milk and its derivatives raises concerns about the microbiological safety and consumption of these cheeses. Among the pathogens frequently isolated from raw milk and its derivatives, the *Staphylococcus* sp. genus stands out. Ingesting raw milk or artisanal cheeses contaminated with *Staphylococcus aureus* strains producing staphylococcal enterotoxins (SEs) can result in staphylococcal food poisoning outbreaks. Additionally, enterotoxigenic strains may exhibit antibiotic resistance profiles, including *mecA*, conferring resistance to methicillin. This study aimed to molecularly characterize *S. aureus*, evaluate the antimicrobial resistance profile, and enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* sp. in samples of colonial artisanal Diamante cheese, as well as to identify bacterial diversity through 16S rRNA gene sequencing. Fifty-seven isolates of *S. aureus* were identified, with notable resistance to penicillin (33.33%), followed by clindamycin (28.07%), erythromycin (26.31%), and tetracycline (22.80%). Tested strains also demonstrated inducible resistance to clindamycin, including nine multidrug-resistant isolates. Although no enterotoxins and/or their producing genes were detected in the samples and isolates, respectively, the Panton-Valentine leukocidin gene was found in 38.9% of isolates. Type agr I was the most prevalent (61.90%), followed by type II (23.81%), with ten spa types identified (t1451, t002, t189, t2734, t105, t518, t17308, t11712, t127, t521). The metataxomic profile revealed the presence of 68 distinct species in the cheese samples. Understanding microbial diversity is crucial for managing the quality of cheeses made from raw milk.

**Keywords:** Molecular characterization, antimicrobial resistance, food poisoning, metataxomics analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colônias típicas e atípicas de <i>Staphylococcus</i> sp. em ágar Baird Parker (BPA) .....	56
Figura 2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana com fenótipos de resistência no teste de difusão em disco (Teste D). .....	71
Figura 3. Amplificação por PCR do gene <i>nuc</i> nos isolados de <i>S.aureus</i> . .....	76
Figura 4. Prevalência do filo (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.....	87
Figura 5. Prevalência das Famílias (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.....	88
Figura 6. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.....	89
Figura 7. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor A. ....	90
Figura 8. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor B.....	93
Figura 9. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor C.....	94
Figura 10. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor D. ....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade emética, localização genética e massa molecular das enterotoxinas estafilocócicas (SEs).....	29
Tabela 2. Métodos (não exaustivo) para detecção de genes e/ou enterotoxinas estafilocócicas (SEs/SEIs) em leite e produtos lácteos. ....	35
Tabela 3. Kits imunológicos comerciais para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.....	38
Tabela 4. Métodos de detecção de genes de resistência a antibióticos de isolados de <i>Staphylococcus</i> sp. em leite e produtos lácteos. ....	44
Tabela 5. Primers usados para detectar os genes de enterotoxinas, leucocina panton valentine ( <i>lukS-lukF</i> ) e toxina 1 da síndrome do choque tóxico. ....	61
Tabela 6. Primers e as condições da reação para tipagem do locus <i>agr</i> .....	63
Tabela 7. Sequência dos primers e as condições da reação para tipagem da região <i>spa</i> .64	
Tabela 8. Contagens (média) de estafilococos coagulase positivo (log UFC/g) nas amostras de queijo artesanal colonial Diamante com diferentes períodos de maturação (1, 7 e 15 dias). ....	65
Tabela 9. Identificação de cepas isoladas de amostras de queijo artesanal Diamante. .	66
Tabela 10. Resistência fenotípica de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de amostras de queijo colonial artesanal Diamante.....	68
Tabela 11. Características de multirresistência de isolados de <i>S. aureus</i> .....	73
Tabela 12. Genes que codificam as enterotoxinas clássicas , toxina 1 da síndrome do choque tóxico e leucocina Panton-Valentine, tipagem por grupos <i>agr</i> e <i>Spa</i> type em cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de amostras de queijo artesanal.....	75
Tabela 13. Frequência dos <i>Spa</i> types encontrados. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, UNIDADES

**ABNT** - Associação Brasileira de Normas técnicas

**ADH** - álcool desidrogenase

**ALDH** - aldeído desidrogenase

**AGR** - (do inglês accessory gene regulator)

**AgrC** - (histidina proteína quinase)

**AIP** - peptídeo indutor

**ALPHALISA** - (do inglês Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira

**ATCC** – (do inglês American Type Culture Collection)

**Aw** - atividade de água

**BAL** – Bactérias do ácido láctico

**BHI** - (do inglês Brain Heart Infusion)

**BPA** - Ágar Baird Parker

**BPF's** - Boas Práticas de Fabricação

**BrCAST** - Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

**CA-MRSA** - (do inglês Community-acquired S. aureus)

**CLUSTER** - (do inglês 'grupo, aglomerado')

**CLUSTER EGC** - aglomerados gênicos de enterotoxinas

**DTA'S** - (Doenças transmitidas por alimentos)

**EDTA** - (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)

**ELISA** - (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

**ESM** - Método de triagem Europeu

**EUCATS** - (do inglês European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

**g** – grama

**kg** - kilo

**ICMSF** - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

**IN** – Instrução Normativa

**INCSSN** - International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens

**MALDI-TOF-MS** - (do inglês matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

**MAPA** - Ministério da Agricultura e Pecuária

***mecA*** - Gene que codifica a resistência à meticilina

**MGEs** – elementos genéticos móveis

**MHC –II** - complexo principal de histocompatibilidade classe II

**MIC** – Concentração mínima inibitória

**min** – minuto

**MRSA** - (do inglês, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

**MSSA** – (do inglês, Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*)

**MLSB** – (Macrólido-Lincosamida-Estreptogramina B)

**NGS** - Sequenciamento de nova geração

**nm** – nanômetro

**° C:** Graus Celsius

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**pb** – pares de bases

**PBP2A** – (do inglês penicillin binding protein 2A).

**PCR** - (reação em cadeia da polimerase)

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**PVL** - Leucocidina Panton-Valentine

**QMRA** - avaliação quantitativa do risco microbiano

**QS** - quorum sensing

**RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada

**RISPOA** – Regulamento da inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal

**rpm** – rotação por minuto

**S** - segundo

***S. aureus*** – *Staphylococcus aureus*

**SCC*mec*** - cassete cromossômico estafilocócico *mec*

**SCN** - *Staphylococcus* coagulase negativa

**SCP** - *Staphylococcus* coagulase positiva

**SE** – Enterotoxina estafilocócica

**SEA** - Enterotoxina A

**SEB** – Enterotoxina B

**SEC** – Enterotoxina C

**SED** – Enterotoxina D

**SEE** – Enterotoxina E

**SE-LIKE; SEIs** - toxina semelhante à enterotoxina estafilocócica

**SEs** - Enterotoxinas estafilocócicas

**TCR** - receptores de células T

**TGI** - trato gastrointestinal

**TSA** - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

**TSST-1** - toxina 1 da síndrome do choque tóxico

**UFC** – Unidade formadora de colônia

**UFSC**- Universidade Federal de Santa Catarina

**µg** – micrograma

**µL** – microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	20
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
1.1 Introdução.....	22
1.2 <i>Staphylococcus</i> sp.....	24
1.3 Fatores de virulência associados a <i>Staphylococcus</i> sp. ....	28
1.3.1 Enterotoxinas estafilocócicas .....	28
1.3.2 Métodos para determinação de enterotoxinas estafilocócicas.....	33
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente aos antibióticos .....	38
1.4.1 Métodos para avaliação da sensibilidade antimicrobiana e identificação dos genes de resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> sp.....	41
1.5 Fatores de inibição de <i>Staphylococcus</i> sp. em queijos .....	45
1.6 Considerações finais .....	49
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E PREVALÊNCIA DE GENES CODIFICANTE DA TOXINA LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE (PVL) EM ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SP. NO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL DIAMANTE.....	51
2.1 Introdução.....	52
2.2. Material e Métodos.....	55
2.2.1 Obtenção das amostras, identificação fenotípica e enumeração de <i>Staphylococcus</i> sp.....	55
2.2.2 Teste de Confirmação Bioquímico da Coagulase.....	56
2.2.3 Identificação por análise de MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer). ....	56
2.2.4 Teste de sensibilidade aos antibióticos .....	57
2.2.5 Detecção das enterotoxinas nas amostras de queijo artesanal.....	58
2.2.6 Detecção dos genes de virulência em <i>S. aureus</i> .....	59
2.2.6.1 Origem das cepas controles .....	59
2.2.6.2 Extração de DNA.....	59
2.2.6.3 Amplificação dos genes por PCR.....	62
2.2.6.4 Eletroforese em gel e visualização .....	62
2.2.6.5. Tipagem molecular de <i>agr</i> .....	63
2.2.6.6 Tipagem do gene <i>spa</i> .....	64
2.3 Resultados e discussão .....	65

2.3.1 Enumeração de <i>Stapylococcus</i> sp. e detecção de Enterotoxinas em amostras de queijo artesanal .....	65
2.3.2 Identificação dos isolados.....	66
2.3.3 Resistência fenotípica dos isolados de <i>S. aureus</i> .....	68
2.3.4 Detecção de genes de exoproteínas de isolados de <i>S. aureus</i> .....	75
2.3.5 Tipagem <i>agr</i> .....	78
2.3.6 Tipagem <i>spa</i> .....	80
2.4 Conclusão .....	82
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO PERFIL METATAXONÔMICO DA CADEIA DE PRODUÇÃO DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL DIAMANTE.....	83
3.1 Introdução.....	83
3.2 Material e métodos .....	84
3.2.1 Obtenção da amostra .....	84
3.2.2 Análise molecular usando abordagem metataxonômica .....	85
3.3 Resultados e discussão .....	86
3.4 Conclusão .....	96
5.0 CONCLUSÃO GERAL .....	96
REFERÊNCIAS .....	98
ANEXO I .....	123

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo colonial artesanal é considerado um produto tradicional do Sul do Brasil, possuindo diversidade nos seus processos produtivos e grande importância socioeconômica (STEINBACH *et al.*, 2021). Na fabricação de queijos artesanais, a baixa padronização de processo e de produto (peculiar dos produtos artesanais) faz com que cada queijo seja único (DE CASTRO CISLAGHI; BADARÓ, 2021). A recente Lei nº 18.250 de 10 de novembro de 2021, que Dispõe sobre os requisitos exigidos para elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru e adota outras providências, define o queijo colonial artesanal como sendo o produto elaborado por métodos tradicionais, com vinculação territorial, obtido por coagulação do leite cru, fresco ou não, integral ou parcialmente desnatado, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes, complementado ou não pela adição de fermento lácteo específico e/ou alimento/susbtância alimentícia (SANTA CATARINA, 2021).

O queijo colonial artesanal Diamante, produzido no Estado de Santa Catarina, Brasil, é elaborado a partir de leite cru, apresentando massa crua ou semi-cozida, com teor de umidade variando entre baixo, médio e alto, e classificado quanto ao teor de gordura como semigordo, gordo ou extra-gordo. Este queijo possui coloração que varia de amarelo palha a amarelo ouro, apresentando sabor ligeiramente ácido ou amendoado, assim como odor lácteo. Além disso, possui pesos e formatos variáveis (SANTA CATARINA, 2021; DEGENHARDT *et al.*, 2023).

A utilização de leite cru é permitida na fabricação de queijos típicos, com características sensoriais decorrentes da microbiota endógena que se desenvolve no queijo (CISLAGHI; BADARÓ, 2021). Todavia, apesar da apreciação dos produtos artesanais e valorização dos produtos da agricultura familiar, uma das principais preocupações nesse tipo de fabricação e o principal motivo que leva ao não consumo do queijo colonial artesanal é a falta de segurança microbiológica percebida por uma parte dos potenciais consumidores (STEINBACH *et al.*, 2021).

No tocante a potencial contaminação microbiana por microrganismos patogênicos, a ocorrência de *Staphylococcus aureus* é de particular importância na produção dos produtos lácteos, pois este é considerado um importante agente etiológico da mastite em animais destinados a produção de alimentos e uma das principais causas

de doenças transmitidas por alimentos (DTA) aos seres humanos (BASANISI *et al.*, 2017).

*Staphylococcus* sp. são potenciais patógenos comumente encontrados em produtos lácteos, devido principalmente a produção de fatores de virulência (por exemplo, enterotoxinas responsáveis por intoxicação alimentar) e desenvolvimento de resistência antimicrobiana (CAI *et al.*, 2021; PÉREZ *et al.*, 2020). Entre as toxinas secretadas por *S.aureus* estão os superantígenos que incluem as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico (YOUSSEF *et al.*, 2022).

A produção de enterotoxinas pode ocorrer durante a produção e armazenamento do leite contaminado. Embora a pasteurização seja um método eficaz na inativação das células vegetativas, as enterotoxinas pré-formadas são resistentes ao calor e, por isso, permanecem biologicamente ativas após o processamento térmico utilizados na produção dos alimentos (HU *et al.*, 2018; FOX; JIANG; TINOCO, 2020).

Os antibióticos são amplamente utilizados não apenas em humanos, mas também na criação de animais. O uso de antibióticos para tratar infecções, como por exemplo a mastite, pode resultar no surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, que podem ser transmitidos aos seres humanos através da cadeia alimentar (LIAO *et al.*, 2020). Uma vez que estudos mostraram que genes resistentes a antibióticos podem ser transferidos para o trato gastrointestinal humano através de patógenos, o consumo de alimentos contendo bactérias resistentes a antibióticos pode promover a transferência de genes resistentes para humanos, o que representa uma ameaça para saúde pública (HWANG, KIM E KIM, 2017).

A suscetibilidade e resistência aos antibióticos são de importância eminente para todas as doenças provocadas por *S. aureus*. A resistência aos antibióticos pode trazer complicações significativas, dificultando o tratamento da mastite em animais leiteiros, aumentando taxas de morbidade/mortalidade e diminuindo produtividade. A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina, é uma das mais comuns em *S. aureus* (FOX; JIANG; TINOCO, 2020).

Segundo Basanisi *et al.* (2017), a prevalência de *S. aureus* resistente a meticilina (do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) é elevada em diversos contextos, sendo considerado um patógeno emergente em hospitais, na comunidade e na pecuária, trazendo considerável risco a saúde pública. Adicionalmente, o MRSA clínico pode ser transmitido aos seres humanos através da ingestão de alimentos

contaminados, provocando casos de infecção, portanto medidas de rápida detecção e identificação de MRSA em alimentos são fundamentais para prevenir surtos de origem alimentar (CHUNG *et al.*, 2021).

De acordo com Kluytmans (2010), o uso generalizado de antibióticos em combinação com falhas nas condições higiênicas sanitárias na cadeia produtiva de alimentos, pode contribuir para a disseminação de organismos resistentes e de genes de resistência através do contato direto de animais e humanos ou através da cadeia alimentar. Nas últimas décadas, a resistência antimicrobiana foi destacada como um dos problemas mais significativos de saúde pública, despertando a atenção de várias organizações nacionais e globais de saúde, que categorizaram a resistência antimicrobiana como um perigo iminente, apontando diversas preocupações em torno do impacto que os alimentos e os microbiomas relacionados aos alimentos têm na carga global imposta por microrganismos resistentes (TORRES *et al.*, 2021). Em termos, a resistência antimicrobiana pode ser considerada o principal fator de risco para a seleção de bactérias multirresistentes em sistemas alimentares pelo elevado uso de antimicrobianos no sistema produtivo (PENNONE *et al.*, 2022).

Tendo em vista que os métodos tradicionais, baseados no crescimento de microrganismos em meios seletivos e sua subsequente identificação em nível de gênero/espécie usando caracterização fenotípica, não é o suficiente para permitir a discriminação de espécies e/ou linhagens, nem a detecção das relações filogenéticas entre certos grupos de bactérias. Desta forma, a aplicação de métodos moleculares se apresenta como uma ferramenta promissora para analisar de forma abrangente as comunidades microbianas presentes nos queijos e correlacionar a ocorrência de determinadas cepas bacterianas com a qualidade do alimento (RANDAZZO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, com o intuito de compreender e controlar as bactérias multirresistentes nos sistemas de saúde e alimentar, as abordagens moleculares baseadas na avaliação de genomas despontam como tecnologias cada vez mais acessíveis que possibilitam a detecção e caracterização de microrganismos resistentes a antimicrobianos e de genes de resistência antimicrobiana, permitindo o monitoramento e avaliação de risco destinados a mitigar os perigos associados à resistência antimicrobiana (PENNONE *et al.*, 2022).

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese de doutorado foi avaliar a diversidade bacteriana do queijo colonial artesanal Diamante e caracterizar a resistência antimicrobiana e o potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas das amostras de queijos artesanais.

Os seguintes objetivos específicos foram considerados:

- ✓ Realizar uma revisão da literatura científica a respeito da prevalência de *Staphylococcus* sp. em queijos artesanais brasileiros. Verificar a ocorrência de surtos por intoxicação estafilocócica relatados, perfil de resistência antimicrobiana e potencial enterotoxigênico nesse tipo de alimento no Brasil;
- ✓ Isolar e identificar *Staphylococcus* sp. nas amostras de queijos artesanais através de testes fenotípicos e por MALDI-TOF;
- ✓ Caracterizar a resistência antimicrobiana fenotípica de isolados de *Staphylococcus* sp. provenientes do queijo colonial artesanal Diamante por meio da realização de teste de sensibilidade aos antimicrobianos;
- ✓ Detectar a presença de enterotoxinas estafilocócicas no queijo colonial artesanal Diamante através de um sistema de imunoensaio automatizado (ELFA-VIDAS®);
- ✓ Realizar a detecção dos genes codificadores de enterotoxinas, bem como dos genes codificantes da PVL e toxina 1 da síndrome do choque tóxico, nos isolados de *S. aureus* por meio da técnica de PCR.
- ✓ Identificar o *spa-type* dos isolados;
- ✓ Determinar a distribuição dos grupos *agr* (I, II, III e IV) nos isolados;
- ✓ Caracterizar a diversidade bacteriana do queijo colonial artesanal Diamante via identificação de bactérias utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA.

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo, apresentado no formato de artigo de revisão de literatura, foi abordado e discutido o estado da arte relativo aos *Staphylococcus* sp. produtores de enterotoxinas e antibiótico resistentes, as técnicas para detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e resistência aos antimicrobianos e a relação deste gênero de patógenos com os queijos artesanais brasileiros produzidos a partir de leite cru. Essa revisão foi publicada no periódico *Journal of Dairy Science*, v. 105, p. 5685–5699, 2022, com o título: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses (<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21634>) (Anexo 1). Além de consolidar o título da tese, esse artigo representa a base teórica e o estado da arte desta tese de doutorado.

### ***Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos e antibiótico resistentes na cadeia produtiva de queijos artesanais de leite cru do Brasil**

**Resumo:** Os queijos artesanais brasileiros são caracterizados pelo uso de leite cru. A fabricação de queijos de leite cru é uma tarefa desafiadora, pois a microbiota do leite cru destinados à produção de queijos de leite cru tem que alcançar o equilíbrio certo entre as bactérias benéficas que irão contribuir para as características sensoriais e de conservação e as bactérias deteriorantes e/ou patogênicas que representam um perigo para segurança dos alimentos. Dentre os microrganismos patogênicos, destaca-se o gênero *Staphylococcus* sp., que podem contaminar queijos de leite cru por diferentes fontes, desde a ordenha até o processamento. A intoxicação alimentar estafilocócica resulta do consumo de alimentos nos quais estafilococos coagulase-positivos, principalmente *Staphylococcus aureus*, desenvolveram e produziram enterotoxinas (SEs). Além disso, uma preocupação emergente de saúde pública é o aumento da resistência antimicrobiana de algumas cepas de *Staphylococcus*. Além disso, a capacidade de *Staphylococcus* sp. em compartilhar genes relacionados à resistência a antibióticos com outras bactérias aumenta esse problema. À luz dessas observações, esta revisão tem como objetivo discutir a presença, SEs e resistência a antibióticos de *Staphylococcus* sp. em queijo artesanal brasileiro produzido com leite cru.

**Palavras-Chave:** perfil de virulência, queijo artesanal, segurança dos alimentos, enterotoxina estafilocócica

## 1.1 Introdução

A fabricação de queijos evoluiu como forma de preservar o leite cru por fermentação. A microbiota autóctone benéfica do leite composta principalmente por *lactobacilos*, *estreptococos* e *lactococos*, ou, por inoculação direta de bactérias ácido lácticas como culturas iniciadoras, fermentam o leite gerando produtos lácteos e geram concorrência com contaminantes microbianos ou patógenos humanos (D'AMICO; DONNELLY, 2017).

O Brasil se destaca por ser o quarto maior produtor de queijos do mundo, produzindo aproximadamente 730 mil toneladas de queijo por ano, número em contínuo crescimento (ABIQ, 2021). Mais de 30 tipos de queijos artesanais são conhecidos no Brasil. Os queijos artesanais brasileiros são aqueles feitos por métodos tradicionais que têm ligação territorial, regional ou cultural e que respeitem os protocolos de elaboração estabelecidos para cada variedade, geralmente são produzidos a partir de leite cru (BRASIL, 2019).

A tendência moderna de consumo por produtos naturais, pouco processados e “clean label” relaciona-se com o potencial consumo de leite cru, em países onde existe essa possibilidade regulatória (e.g. EUA, Itália). Embora na Itália, por exemplo, haja a recomendação de ferver o leite antes do consumo. Isso é apoiado por uma percepção pública tendenciosa de que o leite cru está associado a benefícios nutricionais que supostamente são perdidos após o processamento térmico (O'CALLAGHAN *et al.*, 2019). Da mesma forma, os queijos produzidos com leite cru ganham importante relevância nesse contexto.

A exceção da alteração sensorial, o tratamento térmico (UHT e tratamentos similares) não altera substancialmente o valor nutricional ou outros benefícios associados ao consumo de leite cru (CLAEYS *et al.*, 2013). Porém, o consumo de leite cru pode representar um risco aumentado à saúde devido a possíveis contaminações com patógenos (e.g. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., patotipos de *Escherichia coli*).

A presença de patógenos em produtos artesanais produzidos a partir de leite cru é uma preocupação para os produtores e órgãos regulatórios. Tendo em vista a crescente aceitação no Brasil dos queijos artesanais seguindo tendência de consumo, a avaliação da segurança microbiológica pelos serviços de inspeção é de suma importância nos locais de produção e requer o estabelecimento de diretrizes adequadas para a obtenção do leite e produção do queijo, de forma a preservar a saúde dos consumidores (ANDRETTA *et al.*, 2019).

A presença de patógenos em queijos pode ter sua origem na matéria prima não pasteurizada, do ambiente onde o mesmo é produzido, como também serem provenientes daqueles que os manipulam durante as etapas de fabricação. Dentre os enteropatógenos destaca-se as linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* sp. que representa um elevado risco à saúde do consumidor não apenas pela intoxicação alimentar resultante da ingestão da enterotoxina liberada no alimento como também pelo perfil de resistência a antimicrobianos apresentada por algumas linhagens (ROLA *et al.*, 2015). O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais comumente encontrado em processos tradicionais de fabricação de queijos artesanais (FLEUROT *et al.*, 2014).

Os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido relatados no decorrer dos anos em todo o mundo. De acordo com dados do Ministério da Saúde, somente no Brasil, entre os anos de 2016 a 2019, foram notificados 626 surtos de DTA (BRASIL, 2020). As DTA têm impacto direto na saúde pública. Na literatura, as DTA decorrentes do consumo de queijos ocorrem em todos os países. No entanto, no Brasil, devido à escassez de dados epidemiológicos e os casos de surtos subnotificados, até o presente momento, nenhuma avaliação de risco foi realizada para cadeias de produção de queijos produzidos a partir de leite cru (CARVALHO *et al.*, 2019).

Devido a necessidade de regulamentar a produção dos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) divulgou a Instrução Normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013 que permite a fabricação de queijos artesanais com leite cru, tendo um período menor de 60 dias de maturação, desde que atenda as exigências, como estudos técnicos-científicos que devem comprovar que a redução no tempo de maturação não afeta a qualidade e inocuidade do produto (BRASIL, 2013).

Conforme o Decreto nº 10.468 de 18 de agosto de 2020, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal (RISPOA), a legislação

brasileira exclui a obrigatoriedade da pasteurização do leite, destinado a elaboração de queijos, quando submetidos a um processo de maturação, a uma temperatura superior a 5° C, durante um período não inferior a sessenta dias e sendo comprovadamente seguro através de ensaios analíticos (BRASIL, 2020).

A garantia da segurança dos alimentos pode ser assegurada por meio da implementação de ferramentas de gestão da qualidade, entre as quais destacam-se as Boas Práticas de Fabricação (BPF's), Procedimentos Operacionais Padrão de Saneamento (SSOP) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

*S. aureus* é de particular importância de estudo em produtos lácteos por se tratar de uma das principais causas de DTA (FOX; JIANG; TINOCO, 2020). A gestão de processo, o monitoramento das cadeias de produção e ações preventivas no controle do processamento de laticínios devem ser realizadas para diminuir a disseminação de cepas de *Staphylococcus* sp. com o objetivo de proteger a população do consumo de produtos potencialmente contaminados por toxinas e cepas enterotoxigênicas e que apresentem resistência a antimicrobianos.

O objetivo desta revisão é discutir o estado da arte relativo aos *Staphylococcus* sp. produtores de enterotoxinas e antibiótico resistentes, as técnicas para determinação de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e resistência aos antimicrobianos e a relação deste gênero de patógenos com os queijos artesanais produzidos a partir de leite cru.

## 1.2 *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* compreende mais de 70 espécies e subespécies catalogadas até o momento (<https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>). Estas bactérias são ubiqüitárias (GRACE; FETSCH, 2018; LEROY *et al.*, 2020). Em específico, *S. aureus* coloniza a pele, a mucosa naso-faríngea e em menor proporção o trato gastrointestinal (TGI) de humanos e animais (PREZZI *et al.*, 2020). São bactérias Gram-positivas, em formato de cocos esféricos, não esporulante, sem motilidade, anaeróbias facultativas e produtoras de catalase (HENNEKINNE, 2018). *Staphylococcus* sp. são divididos em dois grupos de acordo com a capacidade de produção da enzima coagulase,

envolvida na cascata de coagulação do plasma: coagulase positiva (SCP) e coagulase negativa (SCN) (PODKOWIK *et al.*, 2013).

SCN pertencem a um grupo heterogêneo de microrganismos normalmente encontrados na microbiota da pele de humanos e animais, sendo atualmente classificados como patobiontes, principalmente como nosocomiais potencialmente patogênicos. Estas bactérias, de grande interesse também na medicina veterinária, representam uma das principais causas de mastite bovina clínica e subclínica de alto impacto econômico (KLIBI, *et al.*, 2018; TURCHI *et al.*, 2020). Todavia, *S. aureus* (SCP) destaca-se como um dos patógenos mais comuns associados aos quadros de mastite clínica e subclínica em bovinos (HOEKSTRA *et al.*, 2020).

Geralmente os SCN têm baixo potencial de virulência em relação ao *S. aureus*, porém, devido a maior incidência em infecções nosocomiais, estes, representados pelas espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* estão associados a pacientes que apresentam fatores de risco clássicos para infecções hospitalares (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2019).

SCN apresentam capacidade de aderir a materiais biológicos e formar biofilmes. *S. epidermidis* é considerado um patógeno oportunista responsável por infecções associadas a contaminação de dispositivos médicos hospitalares (XU *et al.*, 2020). *S. aureus* por ter, em geral, maior potencial de virulência, consegue infectar tanto pacientes hospitalizados quanto pacientes comunitários, sem fatores de risco, de forma mais incidente que os SCN. Os SCN são também resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, incluindo a meticilina e vancomicina, o que limita as opções de tratamento para infecções por estes agentes (KÜREKCI, 2016).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* são um dos principais agentes etiológicos que provocam doenças em todo o mundo. Entre as várias patologias causadas por esses patógenos (*e.g.* infecções respiratórias, abscessos cutâneos, infecções dos tecidos moles, bacteremia, endocardite infecciosa) (EL-FAR *et al.*, 2021), constitui motivo de preocupação mundial de saúde pública e de importância para a microbiologia de alimentos, a intoxicação causada pelo consumo de alimentos contaminados com quantidades suficientes de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) termorresistentes, produzidas predominantemente por cepas SCP (principalmente por *S. aureus*) e ocasionalmente por espécies coagulase negativas (ABDEL-HAMEID AHMED *et al.*, 2019; CHIEFFI *et al.*, 2020).

*S. aureus* é considerado um dos três mais importantes patógenos transmitidos por alimentos que pode causar patologias em seres humanos (AL-NABULSI *et al.*, 2020). Cepas de *S. aureus* produzem uma gama diversa de toxinas (LEKE *et al.*, 2017). A DTA por SE é classificada pelo *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) no grupo de risco III, que inclui as doenças de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas autolimitados, mas que causam severo desconforto. Em geral, o período de incubação e a gravidade dos sintomas depende da quantidade de SE ingerida e da susceptibilidade do indivíduo.

Conforme relatado por Rajkovic (2016), os sintomas são de início rápido podendo ocorrer entre 30 minutos e até 8 h após a ingestão do alimento contaminado. Em quadros clínicos moderados a graves, os sintomas apresentados variam de dor abdominal, emese, diarreia, tontura, lassidão, mialgia, cefaleia, febre moderada e baixa pressão arterial. Na maioria dos casos, a recuperação é sem intercorrências e ocorre no período de 24 a 48 h. As taxas de mortalidade são baixas (0,03% dos casos confirmados) de incidência principal em crianças (< 5 anos), idosos e imunocomprometidos (RAJKOVIC, 2016; STEWART, 2017). Ainda que as manifestações clínicas sejam bem descritas, a fisiopatologia dos sintomas é apenas parcialmente compreendida (ROSENGREN; LINDBLAD; e LINDQVIST, 2013; HU e NAKANE, 2014).

As células de *S. aureus* não são capazes de sobreviver em temperaturas de pasteurização e esterilização durante o processamento de alimentos. No entanto, no leite, as SEs apresentam resistência à temperatura, representada por valores médios de D a 121 e 100°C, entre 9,9 - 11,4 a 70 min, respectivamente (MEDVEĐOVÁ; VALÍK, 2012). Embora as células de *S. aureus* não sejam capazes de sobreviver, as SEs pré-formadas no alimento conseguem resistir aos processos térmicos clássicos da indústria de alimentos (ZIUZINA; LOS; BOURKE, 2018).

O leite cru e seus derivados são produtos frequentemente contaminados com cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* sp. (TITUCHE *et al.*, 2019; LEROY *et al.*, 2020), sendo o consumo de leite cru e queijos produzidos a partir de leite cru um potencial risco para o consumidor (ANGELIDIS *et al.*, 2020). Johler *et al.* (2015a, 2015b, 2018) relataram surtos de intoxicação alimentar estafilocócica associados ao consumo de queijos artesanais.

Ferreira *et al.* (2016) relataram a presença de *S.aureus* em 56 amostras de queijo artesanal e em 10 amostras de queijo Minas Frescal industrializado, comercializados no estado de Goiás (Brasil). Entre as amostras analisadas 20% apresentaram contagens de SCP acima do limite atualmente estabelecido no Brasil ( $3 \log_{10}$  UFC/g) (BRASIL, 2019). Os resultados também mostraram que 13 (44,8%) dos isolados de *S.aureus* em amostras de queijo de leite cru apresentaram genes codificadores de enterotoxinas.

Nunes e caldas (2017) realizaram uma avaliação quantitativa do risco microbiano (QMRA), obtendo dados de SCP de 350 amostras de queijo Minas Frescal de plataformas de monitoramento brasileiro. Os dados foram usados como uma procuração para contaminação por *S. aureus*. O trabalho de Arcuri *et al.* (2010) foi utilizado para definir (73%) a variável de prevalência de cepas toxigênicas. O estudo avaliou preliminarmente o risco associado à intoxicação por SEs devido ao consumo pela população brasileira. Na avaliação, a dose toxigênica de SE de 100 ng ou mais foi utilizada para calcular a probabilidade cumulativa de eventos de ingestão. Embora o estudo tenha identificado a falta de dados necessários para obter uma melhor avaliação quantitativa de risco microbiano, a avaliação indicou que a intoxicação por consumo é de baixo risco.

Os manipuladores de alimentos colonizados assintomáticos de *Staphylococcus* sp. podem desempenhar papel importante na disseminação dos microrganismos, principalmente durante o processo de fabricação por contaminação cruzada. Todavia, treinamentos periódicos e intensivos de boas práticas, higiene e saúde dos manipuladores podem reduzir o problema (BENCARDINO *et al.*, 2021).

A manipulação inadequada de alimentos é uma das principais causas de DTA, diretamente associada aos surtos que ocorrem em ambiente doméstico e/ou serviços de alimentação. De acordo com o estudo realizado por Nasrolahei *et al.* (2017) com 220 manipuladores de alimentos que trabalhavam com diferentes tipos de alimentos; 62,2% (137) eram portadores de bactérias patogênicas nas unhas, com 46% correspondente ao *S. aureus* e 65% (144) apresentavam o microorganismo em suas narinas.

Outro fator preocupante no que se refere a contaminação por *S. aureus* associada aos manipuladores de alimentos está relacionado com a transmissão de cepas resistente a meticilina, conhecidos pela sigla MRSA (do inglês *methicillin-resistant S. aureus*).

Um estudo realizado com manipuladores de alimentos em hospitais localizados no Nordeste do Brasil, revelou que dos 140 manipuladores, 50% (70) apresentavam SCP nas mãos e narinas, sendo 93% resistentes a penicilina e 28,6% (40) manipuladores colonizados por MRSA (FERREIRA *et al.*, 2014).

### **1.3 Fatores de virulência associados a *Staphylococcus* sp.**

Os fatores de virulência associados a *S. aureus* podem ser agrupados em duas classes principais que incluem: (i) os componentes estruturais localizados na superfície da célula e (ii) os componentes secretados. Combinados, estes fatores favorecem o patógeno a escapar das defesas do hospedeiro e colonizar, por exemplo, as glândulas mamárias dos bovinos, podendo estar associados também a danos celulares/teciduais.

Entre os componentes estruturais estão incluídos os fatores ancorados à membrana (proteínas de ligação ao colágeno, ao fibrinogênio, a elastina, a fibronectina e ao ácido lipoteicóico), os fatores ligados a parede celular (peptidoglicano, ácido lipoteicóico, ácido teicóico e proteína A) e os fatores associados à superfície celular (cápsula). Os fatores de virulência secretados são, em geral, toxinas extracelulares [SEs, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), Leucocidina Panton-Valentine (PVL), hemolisinas e esfoliatina] e as enzimas (coagulase, estafiloquinase, DNAase, fosfatase, lipase, fosfolipase e hialuronidase) (VAUGHN *et al.*, 2020).

#### **1.3.1 Enterotoxinas estafilocócicas**

A nomenclatura para as SEs usada neste trabalho de revisão segue as regras propostas pelo *International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature* (INCSSN). O INCSSN propôs que apenas toxinas exibindo atividade emética após a administração oral em modelo primata sejam designadas como SEs. As outras toxinas relacionadas sem atividade emética ou ainda não testadas para esta atividade foram recomendadas para serem designadas como "toxina semelhante à enterotoxina estafilocócica" (SE-like; SEI) (LINA *et al.*, 2004). Portanto, conforme possa provocar emese, as SEs (Tabela 1) podem ser separadas em dois grupos principais, SEs clássicas (SEA a SEE) e novos tipos de proteínas do tipo enterotoxigênico (SEIs) (SEG a SEIX) (ABOLGHAIT *et al.*, 2020). As SEIs são consideradas enterotoxinas por sua

estrutura molecular, mas não demonstram potencial emético em modelos de primatas como preconizado pela INCSSN (UMEBA *et al.*, 2017).

Tabela 1. Atividade emética, localização genética e massa molecular das enterotoxinas estafilocócicas (SEs).

SE	Nome revisado arbitrariamente	Atividade emética	Localização do gene	Massa Molecular (KDa)
SEA		+	Fago	27,1
SEB		+	Ilha de patogenicidade	28,4
SEC <sub>1</sub>		+	Ilha de patogenicidade	27,5
SEC <sub>2</sub>		+	Ilha de patogenicidade	27,6
SEC <sub>3</sub>		+	Ilha de patogenicidade	27,6
SEC <sub>Bovino</sub>		+	Ilha de patogenicidade	27,6
SED		+	Plasmídeo	26,9
SEE		+	Fago	26,4
SEG		+	Ilha de patogenicidade	27,0
SEH		+	Cromossomo	25,1
SEI		+ <sup>b</sup>	Ilha de patogenicidade	24,9
SEJ	SEIJ	+	Plasmídeo	28,5
SEK	SEIK	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	26,0
SEL	SEIL	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	26,0
SEM	SEIM	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	24,8
SEM	SEIN	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	26,1
SEO	SEIO	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	26,7
SEIP		+* <sup>a</sup>	Fago	27,0
SEQ	SEIQ	+* <sup>a</sup>	Ilha de patogenicidade	26,0
SEIR		+	Plasmídeo	27,0
SES		+	Plasmídeo	26,2
SET		+ <sup>b</sup>	Plasmídeo	22,6
SEU	SEIU	ND	Ilha de patogenicidade	27,1
SEU <sub>2</sub>	SEIU <sub>2</sub>	ND	ND	27,0
SEIV		ND	Cluster <i>egc</i> e cromossomo	27,6
SEIX		ND	Cromossomo	19,3

SEA-SEH: enterotoxinas estafilocócicas; SEI-SEIX: tipo de toxina semelhante à enterotoxina estafilocócica; *cluster egc*: aglomerados gênicos de enterotoxinas (*seg, sei, sem, sen e seo, seu*); \*<sup>a</sup> atividade emética testada por Omeo *et al.* (2013) \*<sup>b</sup> atividade emética fraca; ND: não determinado e/ou relatado.

Fonte: adaptada de Uchiyama *et al.* (2006), Langley *et al.* (2015) e Castro, Silva e Teixeira (2018).

As SEs são consideradas o fator mais importante ligado a intoxicação de origem alimentar pelo gênero *Staphylococcus*, sendo estas toxinas geralmente encontradas no leite e seus derivados (NOURI; AHARI e SHAHBAZZADEH, 2018).

As SEs consistem em uma superfamília de 24 proteínas estruturalmente relacionadas com base na homologia de sequência, com pesos moleculares de 22 a 28 kDa, que combinam atividades superantigênicas e eméticas (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). São exotoxinas pirogênicas de baixo peso molecular que compartilham semelhanças funcionais (FOX; JIANG; TINOCO, 2020). São solúveis em água e soluções salinas, altamente estáveis e resistentes a condições ambientais que destruiriam facilmente a célula vegetativa produtora. Também resistem a enzimas proteolíticas (e.g. tripsina, pepsina), enzimas coagulantes (e.g. papaína, renina, quimotripsina) e a baixos valores de pH, persistindo durante o processo de fabricação de queijos e na acidez do TGI após a ingestão (LOIR; HENNEKINNE, 2014; ABOLGHAIT *et al.*, 2020).

A desnaturação térmica das SEs gera perda da atividade biológica. A potência dessas toxinas diminui gradativamente a partir do aumento da temperatura (HU; NAKANE, 2014). Alguns surtos resultaram da ingestão de alimentos que foram tratados termicamente após a produção da SE (LOIR; HENNEKINNE, 2014).

Neste contexto, com o objetivo de estudar a influência do tratamento térmico usado na produção industrial de alimentos sobre a viabilidade de *S. aureus* e suas SEs, Pepe *et al.* (2006) inocularam *S. aureus* produtor de SEA em costeletas de frango empanadas. A atividade da SEA foi monitorada durante todas as etapas do processo (preparação, cozimento, fritura e armazenamento). Como esperado, os tratamentos térmicos foram capazes de inativar as células bacterianas (redução de  $\sim 7 \log_{10}$  UFC/g). Entretanto, a SEA foi detectada nas costeletas após cozimento e fritura, indicando assim que a SEA resistiu ao duplo tratamento térmico a 180°C.

Necidova *et al.* (2016) inocularam cepas de *S. aureus* capazes de produzir as SEs A, B e C em amostras de leite e, em seguida, aplicaram tratamento térmico com temperaturas de 72°C, 85°C e 92°C por 15s. Após o processamento térmico, todas as SEs apresentaram redução na sua detecção, com valores de 45%, 52% e 87%, respectivamente. Embora tenha sido observado que as temperaturas de pasteurização possam reduzir parcialmente as SEs, a sua inativação depende também da quantidade presente no alimento.

A dose para que ocorra a intoxicação por SE é inferior a 1 µg, um nível atingido quando as populações de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos excedem 5 log<sub>10</sub> UFC/g de alimento. Em pessoas mais suscetível a ingestão de 0,1 µg pode ser suficiente

para causar sintomas (ABDEL-HAMEID AHMED *et al.*, 2019; NUNES; CALDAS, 2017).

Os efeitos tóxicos das SEs nos primatas apresentam-se como distúrbios entéricos e eméticos. No organismo, algumas SEs agem como superantígenos, interagindo simultaneamente, de forma atípica, com receptores de células T (TCR) e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) nas células apresentadoras de antígenos, o que leva a uma liberação de citocinas, em especial IL1, IL6 e TNF, e ativação inespecífica de linfócitos T, resultando em potencial choque sistêmico e desequilíbrio do sistema imunológico (RUDENKO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Os superantígenos ativam uma porcentagem muito maior de células T do que os antígenos de proteína, resultando em grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, que podem induzir febre, falência de múltiplos órgãos, incluindo fatores de necrose tumoral alfa, interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 6 (STEWART, 2017). Com relação a atividade emética, as SEs interagem com o sistema nervoso entérico estimulando os neurônios aferentes ou induzindo a liberação de neurotransmissores a partir das células enterocromafins que resultam em vômitos, diarreia ou em processo inflamatório no intestino (HU; NAKANE, 2014).

A produção de enterotoxinas é regulada geneticamente por sistemas e mecanismos de regulação gênica (AL-NABULSI *et al.*, 2020). Os genes que codificam as SEs podem ser carregados por elementos genéticos móveis (MGEs), como os plasmídeos, fagos, ilhas de patogenicidade ou ilhas genômicas (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Adicionalmente, genes codificantes de SE podem ser encontrados em aglomerados gênicos cromossômiais, como é o caso do *cluster egc*, que contém os genes codificantes das enterotoxinas G, I, M, N e O, U comumente encontrados entre isolados clínicos de *S. aureus* (VIÇOSA *et al.*, 2013). Alguns destes genes podem ser regulados pelo sistema de *quorum-sensing* denominado *agr* (do inglês *accessory gene regulator*), um dos principais sistemas reguladores que controlam a expressão de genes de virulência descritos em *S. aureus* (DUQUENNE, *et al.*, 2016).

Omeo *et al.* (2013) estudaram a atividade emética de sete SEIs (K, L, M, N, O, P e Q) em macacos (*Macaca fascicularis*) e conforme os resultados reportados, todas SEIs estudadas induziram respostas de vômito no intervalo de 1 a 4,5 h após o

experimento, embora o número de macacos afetados por estas enterotoxinas fosse significativamente menor do que o número de macacos afetados após consumir SEA ou SEB. A análise dos resultados sugere que as SEIs apresentaram atividade emética, embora em menor extensão que as SEs, portanto, podem desempenhar algum papel na intoxicação alimentar. Uma justificativa plausível para que as SEIs, analisadas no estudo citado anteriormente, ainda não serem classificadas como SE, pode ser pelo fato da toxina não apresentar efeito emético em primatas a menos que doses extremamente altas sejam consumidas.

Outra limitação para reclassificar SEIs em SEs pode estar relacionada a falta de elucidação do mecanismo de atividade emética em modelo primata, devido a restrição do uso de macacos na investigação de SEs pelo alto custo, pela disponibilidade dos animais e questões éticas (HU; NAKANE, 2014), além de não existirem estudos conclusivos de sua atividade emética em humanos.

Zhang *et al.* (2018) reportaram duas novas enterotoxinas a partir das espécies *Staphylococcus argenteus* e *Staphylococcus schweitzeri* recentemente reconhecidos como novas espécies intimamente relacionadas com *S. aureus*. As proteínas relacionadas, designadas como toxina semelhante à SE 26 (SEI26) e 27 (SEI27), foram identificadas e caracterizadas. Na pesquisa realizada por Suzuki *et al.* (2020) uma nova enterotoxina (SE02) foi identificada a partir de duas cepas de *S. aureus* (Tokyo12480 e Tokyo12482) que foram isoladas de um surto ocorrido em Tóquio no ano de 2004. A nova SE02 possui bioatividade superantigênica e emética apresentando resistência ao aquecimento (fervura a 100°C) e a digestão com pepsina.

A intoxicação alimentar, no caso de lácteos, pode ocorrer pela ingestão de leite cru ou produtos derivados do leite contaminados com as SEs pré-formadas no alimento. O aumento da frequência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas em produtos lácteos podem acarretar sério risco à saúde dos consumidores (ABDEEN *et al.*, 2020). A enterotoxina A (SEA) é reconhecida como a principal enterotoxina causadora de intoxicação alimentar em humanos em todo o mundo (HU, NAKANE, 2014; ARGUDÍN, MENDOZA, RODICIO, 2010). Nesse contexto, em um estudo realizado por Rosengren, Lindblad e Lindqvist (2013) foi detectada a presença de SEA quando os níveis de *S. aureus* estavam acima de 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL em amostras provenientes de queijo. Abdeen *et al.* (2020) detectaram alta prevalência de SEA, SEB e SED em amostras de leite cru no Egito. Rodrigues *et al.* (2017) detectaram genes de enterotoxinas em amostras de diversos

queijos, onde o gene *seh* (codificante da enterotoxina H; SEH) foi o mais encontrado, seguidos pelos genes codificantes das enterotoxinas SEIX e SER.

No estudo conduzido por Cândido *et al.* (2020), na cadeia produtiva de queijos do tipo Minas Frescal convencional e orgânico, foi detectada a presença de isolados de *Staphylococcus* sp. carreando genes codificantes de enterotoxinas, se destacando o gene *seg* (codificante da enterotoxina G; SEG) em 35,8% dos isolados, seguidos pelo gene *sei* (codificante da enterotoxina I; SEI) (21,1%), não sendo verificada diferenças entre as amostras de tipologia orgânico e convencional. Os principais pontos críticos de transmissão de *S. aureus* na cadeia produtiva de queijos são o processo de salmoura, os utensílios utilizados (*ex.*: lira) e o tipo de leite (cru e/ou pasteurizado) (CÂNDIDO *et al.*, 2020).

A alta diversidade de isolados portadores de genes de enterotoxina demonstra reais motivos de preocupação com a segurança na produção dos queijos artesanais. Contudo, apenas a presença de genes enterotoxigênicos não indica necessariamente a capacidade do microrganismo de produzir a toxina biologicamente ativa e suficiente para provocar manifestações clínicas (MCLAUHLIN *et al.*, 2000).

Nesse sentido, Mehli *et al.* (2017) analisaram diversos produtos lácteos e identificaram em 72 isolados de *S. aureus* que 87,5% (63) apresentavam genes codificantes para as enterotoxinas C (SEC), SEG e SEH.

Ainda nesse contexto, durante a avaliação microbiana da segurança do queijo artesanal do Serro, por abordagens genotípicas e fenotípicas, Andretta *et al.* (2019) não detectaram a presença de SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) ou de genes codificantes dessas enterotoxinas, o que nos sugere que boas práticas de ordenha e condições adequadas de processamento dos produtos artesanais pode diminuir os riscos de contaminação na cadeia produtiva de produtos lácteos.

Os resultados encontrados no estudo de Chieffi *et al.* (2020) sugerem que novas SEs são fonte potencial de surtos, portanto, a detecção de SEs em alimentos, especialmente nos envolvidos em casos de intoxicação, deve relacionar não apenas as SEs clássicas, mas também todos os tipos de novas enterotoxinas (SEIs) identificadas. Para isto, é necessário usar métodos capazes de detectar a produção de todos os tipos de SEs e SEIs conhecidas até o momento.

### 1.3.2 Métodos para determinação de enterotoxinas estafilocócicas

Diversos métodos são usados para detectar enterotoxinas de origem bacteriana nos alimentos: bioensaios, métodos moleculares e técnicas imunológicas (HENNEKINNE *et al.*, 2010; CRETENET; EVEN; LOIR, 2011). Os bioensaios são baseados na capacidade da amostra do alimento suspeito de contaminação induzir os sintomas característicos da intoxicação, como emese, sintomas gastrointestinais, ou ação superantigênica em culturas de células (LOIR; HENNNEKINNE, 2014).

Historicamente as SEs foram detectadas com base na sua atividade emética em primatas, felinos e modelos animais como o musaranho doméstico (*Suncus murinus*), através de testes intraperitoneais. Uma desvantagem dessa técnica é que os sintomas aparecem quando a dose de SEs administrada nos animais apresentam-se acima de 2,3 mg; uma quantidade considerada maior que aquelas envolvidas em intoxicação alimentar humana, não sendo, portanto, uma técnica para caracterizar surtos com precisão (LOIR; HENNNEKINNE, 2014).

As SEs são produzidas em pequenas quantidades em queijos (geralmente < 0,1 ng/g), contudo, esse produto altamente protéico pode interferir nos ensaios de detecção (CRETENET; EVEN; LOIR, 2011). Deste modo, diferentes métodos vêm sendo desenvolvidos para a detecção e identificação de SEs em produtos lácteos (Tabela 2) e, dentre os principais métodos rápidos e sensíveis, alguns são baseados em ensaios de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) (NOURI; AHARI; SHAHBAZZADEH, 2018). A tecnologia imunológica tem alta especificidade e eficiência e não carece de equipamentos complexos. A limitação dos testes ELISA, neste caso, consiste na falta de anticorpos específicos de enterotoxinas que permitam a identificação de todas as SEs existentes (LOIR; HENNEKINNE, 2014) e ainda apresenta a desvantagem de prováveis resultados falsos positivos durante a detecção (ZHAO *et al.*, 2020).

Tabela 2. Métodos (não exaustivo) para detecção de genes e/ou enterotoxinas estafilocócicas (SEs/SEIs) em leite e produtos lácteos.

<b>Produto</b>	<b>Método</b>	<b>SEs ou gene</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Leite	LFIA	SEA	Índia	Upadhyay e Nara (2018)
Leite cru	qPCR	<i>selo, seg, sei, selm, seln, selu<sub>v</sub></i>	Itália	Fusco <i>et al.</i> (2011)
Leite cru	PCR multiplex	<i>sea, sec, sed, ser, seg, seh, sei, seij, seip</i>	Polônia	Rola <i>et al.</i> (2015)
Leite cru	PCR simples e PCR multiplex	<i>sei, seg</i>	Índia	Mahanti <i>et al.</i> (2020)
Leite cru	Eletroforese e ELISA	SEA	Irã	Nouri <i>et al.</i> (2018)
Leite cru e queijo mole	PCR simples	<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	Brasil	Viçosa <i>et al.</i> (2013)
Leite cru e sorvete	PCR multiplex	<i>sea, seb, sed</i>	Egito	Abdeen <i>et al.</i> (2020)
Leite cru, queijos e soro de leite	PCR simples	<i>sec, seg, seh</i>	Noruega	Mehli <i>et al.</i> (2017)
Leite e produtos lácteos	PCR simples e ELISA	<i>sea, seb, sed</i>	Egito	Abdel-hameid Ahmed <i>et al.</i> (2019)
Leite fluido e em pó	AlphaLISA	SEB	China	Zhao <i>et al.</i> (2019).
Queijo Minas	q-PCR	<i>sea, seb, sec, sed</i>	Brasil	Castro <i>et al.</i> (2020)
Queijo Serro	PCR simples e ELISA	<i>sea, seb, sec, sed, see</i>	Brasil	Andretta <i>et al.</i> (2019)
Queijo Minas Frescal orgânico	PCR simples	<i>seg, sei, seb, sec, sed, sej, seh, mar</i>	Brasil	Cândido <i>et al.</i> (2020)
Queijos diversos	PCR simples	<i>sea, seb, seh</i>	Brasil	Farias <i>et al.</i> (2019)
Queijos diversos	PCR multiplex	<i>sea, seb, sed, selj, seg, sei ser, mar, ser, seg, seh, selj, selp</i>	Itália	Johler <i>et al.</i> (2018)
Queijos Minas Frescal	PCR multiplex	<i>seh, seio</i>	Brasil	Ferreira <i>et al.</i> (2016)
Queijos semiduros	qPCR	<i>sea, seb, sec, sed</i>	França	Duquenne <i>et al.</i> (2016)

PCR: Reação em cadeia da polimerase; qPCR: PCR quantitativa em tempo real; ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática; AlphaLISA: Amplified luminescent proximity homogeneous assay; LFIA: Imunoensaio rápido de fluxo lateral.

Dentre as técnicas de ELISA desenvolvidas, Zhao *et al.* (2019) testaram um método denominado de AlphaLISA (do inglês *Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*) que demonstrou ser sensível, específico e rápido para a detecção de SEB. Além disso, em amostras de alimentos, esse método respondeu satisfatoriamente ao efeito matriz do alimento. Quando comparado com o ELISA, o AlphaLISA supera o impedimento estérico da SEA, que é um fator limitante na detecção imune de SEs nos sobrenadantes de cultura de *S. aureus*.

Métodos de espectrometria de massa (MS) quantitativa foram desenvolvidos e demonstraram potencialidade para superar limitações dos métodos ELISA para detectar e quantificar SEs. No entanto, seu custo por análise desfavorece o método. Segundo Loir e Hennekinne (2014), os métodos por MS não se consolidaram como escolha na análise de rotina, mas apenas para confirmação de surtos relacionados a SEs.

Os métodos moleculares são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes métodos detectam regiões de genes que codificam as SEs em cepas isoladas de alimentos contaminados, informando a presença ou ausência de genes que codificam SEs. Porém, eles não fornecem qualquer informação sobre a expressão dos genes alvo nos alimentos, não podendo ser utilizado como único método para confirmar, por exemplo, a produção da enterotoxina ou da cepa de *S. aureus* potencialmente responsável pelo surto alimentar (LOIR; HENNEKINNE, 2014).

Em geral, métodos moleculares são os mais utilizados para a detecção dos genes codificantes de SEs e genes para identificação da espécie em produtos lácteos. Os métodos de PCR simples ou multiplex foram projetados para a triagem de genes que codificam cada enterotoxina. Essa abordagem requer conjuntos de iniciadores específicos direcionados a cada gene (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

O Método Europeu de Triagem (ESM) com base na extração, concentração por diálise e detecção imunoquímica qualitativa tem como alvo principal cinco SEs (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), porém, não é capaz de distinguir entre elas, sendo necessário analisar a amostra com um método confirmatório, como por exemplo, o método ELISA. No entanto, como já mencionado, o método ELISA pode gerar resultados falsos positivos por interferências decorrentes da matriz alimentar ou causadas por enzimas endógenas, como a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase do leite cru (ZELENY *et al.*, 2015).

Upadhyay e Nara (2018) relataram um método de crescente interesse para detecção rápida de SEs, denominado de imunoensaio rápido de fluxo lateral (LFIA). O ensaio fundamenta-se no formato sanduíche e utiliza dois anticorpos monoclonais

específicos contra a SE, um dos quais é marcado com nanopartículas de ouro e o outro é imobilizado na linha de controle. O método pode ser adequado para testar presença de SEA em amostras de leite, com fácil execução, reprodutibilidade e estabilidade a 4°C, sendo ainda rápido e eficaz sem necessidade de pré-incubação com amostras controle de toxinas.

No desenvolvimento de métodos para detecção de SEs, Zeleny *et al.* (2015) destacaram a importância do estudo de materiais de referência (RM) para medições precisas da SEA de *S. aureus* em alimentos. Os RM consistem em toxinas e materiais matriciais que contêm uma ou mais toxinas em diferentes níveis nas matrizes alimentares, como queijo, leite ou presunto. Dentro dessa abordagem, os autores realizaram um estudo que possibilitou prever a característica do RM e a atribuição de valor de SEA em níveis inferiores a ng/g em matrizes de queijo, constituindo um passo importante para o desenvolvimento de um RM certificado para SEA.

A detecção e quantificação de SEs em produtos lácteos, especialmente na matriz queijo, são exigidas por diversos órgãos regulatórios, como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), através da Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022, que se aplica de maneira complementar a RDC nº 724 de 01 de julho de 2022 que abrange toda a cadeia produtiva de alimentos e define os padrões microbiológicos para alimentos e sua aplicação (BRASIL, 2022).

A detecção da enterotoxina nos alimentos é a forma mais conclusiva para associar a presença da toxina ao consumo de determinado alimento causador da intoxicação. Nesse sentido, uma série de métodos imunológicos comerciais para detecção de enterotoxinas nos alimentos foram desenvolvidos (Tabela 3).

Tabela 3. Kits imunológicos comerciais para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos.

<b>Kit</b>	<b>Método</b>	<b>Fabricante (país)</b>
SET-RPLA	Aglutinação em látex de fase reversa	Denka Seiken (Japão)
SET-EIA	ELISA	Toxin Technology (EUA)
TECRA	ELISA	Bioenterprises (Austrália)
TRANSIA PLATE	ELISA	Diffchamb (Suécia)
RIDASCREEN SET	ELISA	Biopharm GmbH (Alemanha)
VIDAS SET	ELISA	BioMérieux AS (França)

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Fonte: adaptado de Pimenta-Martins *et al.* (2013).

Dentre os métodos imunológicos, o ELISA sanduíche é o mais utilizado, pela disponibilidade comercial dos reagentes no formato monovalente e polivalente, o que significa que, tanto pode ser usado para o *screening* de enterotoxinas, como para identificação de uma SE específica. Kits ELISA comerciais para detecção de SEs A e E são acessíveis e de baixo custo. Os kits baseados em anticorpos monoclonais eliminam a reatividade cruzada que pode ser observada entre SEs semelhantes (*e.g.* SEA e SEE). Os testes apresentam como limite de detecção em média 0,1 a 1,0 ng de enterotoxina por grama de alimento (STEWART, 2017).

Testes de aglutinação passiva reversa com sensibilidade de 0,5 ng/mL estão também disponíveis comercialmente.

#### 1.4 *Staphylococcus aureus* resistente aos antibióticos

*S. aureus* foi classificado pela World Health Organization (WHO) como um dos patógenos prioritários por representar uma ameaça à saúde humana em termos da multirresistência a agentes antimicrobianos (WHO, 2017).

Dois mecanismos de resistência diferentes são responsáveis pela resistência aos agentes do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos nos estafilococos: (i) inativação enzimática por  $\beta$ -lactamase codificada por gene *blaZ* que confere resistência às penicilinas, exceto isoxazolil-penicilinas, e (ii) modificação do sítio de ação dos beta-lactâmicos (PBPs da parede celular) pelos produtos gênicos do *mecA* ou *mecC* (PBP2A) (WENDLANDT *et al.*, 2013).

A resistência as penicilinas estáveis a penicilinases, também denominada resistência a meticilina ou oxacilina, se manifesta como sendo resistência a praticamente todos os agentes antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactamâmicos, incluindo as cefalosporinas e carbapenêmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, que permanecem, até o momento, ativas contra *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), como, por exemplo, a ceftarolina (ONICIUC *et al.*, 2017).

As primeiras cepas clínicas de MRSA começaram a ser detectadas no início dos anos 1960, logo após a introdução da meticilina e outras penicilinas semissintéticas na clínica. A resistência dos MRSA está relacionada à aquisição de um fragmento de DNA, denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que carrega o gene *mecA*, responsável por codificar uma proteína com baixa afinidade de ligação a  $\beta$ -lactâmico, denominada de PBP2A (*Penicillin Binding Protein 2A*). A síntese da PBP2a permite que as bactérias sintetizem a parede celular bacteriana mesmo na presença de  $\beta$ -lactâmicos, conferindo a resistência à praticamente todos os antimicrobianos desta classe (CHATTERJEE; OTTO, 2013).

Em 2011, um homólogo do *mecA*, designado como *mecC*, foi encontrado em isolados de humanos e animais, despertando o interesse para a microbiologia humana e veterinária (DIAZ *et al.*, 2016). Este homólogo apresenta dificuldade de diagnóstico, com o potencial de ser erroneamente diagnosticado como sensível à meticilina, podendo por sua vez apresentar consequências graves para pacientes e para a vigilância de MRSA (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011). O *mecC* está localizado em um novo cassete SCC*mec* tipo XI e exibe 69% de homologia com *mecA* e 63% de identidade com o PBP2a codificado por *mecA* (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014).

MRSA causam importantes infecções nosocomiais e comunitárias e representam atualmente cerca de 60% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados em países como EUA e Brasil (REIS *et al.*, 2020). Esta percentagem é extremamente variável no mundo. Em geral, países em desenvolvimento tem taxas maiores que países desenvolvidos. Estudos em países da América latina demonstraram incidência superior a 90% de MRSA entre os *S. aureus* isolados (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2010). No Canadá índices de 23% foram descritos (ZHANEL *et al.*, 2013).

Nos últimos 20 anos, tem sido marcante o surgimento de casos de infecções fora do ambiente hospitalar, envolvendo cepas de MRSA associadas à comunidade ou adquiridas na comunidade (denominadas CA-MRSA, do inglês *Community-acquired S. aureus*). Estas são consideradas uma ameaça à saúde pública por serem facilmente

disseminadas por portadores considerados saudáveis e por apresentarem um potencial aumentado de virulência quando comparado às cepas nosocomiais (HERRERA; GARCÍA-LOPEZ; SANTOS, 2016).

Segundo Rimoldi *et al.* (2018) e Abolghait *et al.* (2020) a incidência de infecções por CA-MRSA aumentou entre a população em geral nas últimas décadas. No estudo de Rodrigues *et al.* (2017) foi relatada a presença de isolados CA-MRSA em amostras de leite cru e queijos.

O surgimento de *S. aureus* resistentes aos antibióticos no ambiente agrícola pode estar associado principalmente a pressão seletiva exercida pelo uso consolidado de antimicrobianos para tratar infecções como, por exemplo, a mastite bovina.

O risco de aparecimento e de transmissão de patógenos resistentes aos antimicrobianos pode aumentar em decorrência do uso excessivo de medicamentos nos animais, seja como promotor do desenvolvimento zootécnico ou para prevenir e/ou tratar doenças infecciosas (ZEINHOM; ABED, 2021). Alguns exemplos são as tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrólídeos e sulfametoxazol, principais fármacos para uso terapêutico em animais produtores de alimentos (ROLA *et al.*, 2015).

Quando se trata de transmissão via alimentos, o surgimento de MRSA colonizando de forma assintomática ou causando infecções em animais produtores gera potencial disseminação pela cadeia produtiva (DOULGERAKI *et al.*, 2017; MAMA *et al.*, 2019).

Embora o isolamento de MRSA proveniente de matérias primas de origem animal e alimentos associados seja relatado, DTA por MRSA ainda foram pouco descritas (HERRERA; GARCÍA-LOPEZ; SANTOS, 2016). Os alimentos que mais se destacam como via de transmissão são o leite cru e os produtos lácteos produzidos a partir de leite cru (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; GAJEWSKA, 2019).

Conforme pesquisa realizada por Titouche *et al.* (2019), amostras de leite cru demonstraram que a maioria dos isolados apresentou resistência a penicilina G e a tetraciclina, com a presença de algumas cepas MRSA.

Amostras de leite cru do Egito também revelaram a presença de isolados MRSA (ZAYDA *et al.*, 2020). Outros trabalhos relataram ainda diversos perfis de resistência a antimicrobianos em leite cru (ROLA *et al.*, 2015; JAMALI *et al.*, 2015). Produtos lácteos na Grã-Bretanha demonstraram a prevalência de MRSA com genes *mecC* (PATERSON *et al.*, 2013).

Abdeen *et al.* (2020) confirmaram a presença de isolados de MRSA em amostras de leite e sorvete com resistência à sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina, norfloxacin, penicilina e cefradina, apresentando, no entanto, sensibilidade à gentamicina e vancomicina.

Moura *et al.* (2018) identificaram a presença de MRSA em amostras de leite de cabra no estado de Ohio (EUA). Aragão *et al.* (2019) relataram a presença de genes *blaZ* e de resistência a meticilina em cepas de *S. aureus* em queijos artesanais tipo coalho feitos com leite de cabra produzidos no nordeste do Brasil.

Em trabalho publicado por Herrera *et al.* (2016) foram detectadas cepas de CA-MRSA em queijo Doble Crema na Colômbia, indicando contaminação humana como vetor. Os isolados apresentaram resistência à cefoxitina, oxacilina, penicilina e ampicilina (caracterizando-os como MRSA) e foram sensíveis a todos os antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos testados. Achados semelhantes com amostras de leite de diferentes espécies na Jordânia revelaram a resistência dos isolados de *S. aureus* a um grande número de antimicrobianos, dentre eles, penicilina, ampicilina, clindamicina, tetraciclina, gentamicina, rifampicina, eritromicina, cefotaxima, doxiciclina, amoxicilina + ácido clavulânico, cloranfenicol, sulfametoxazol + trimetoprim e ciprofloxacina (OBAIDAT *et al.*, 2018).

O estudo de Klibi *et al.* (2018) relatou que SCN isolados de leite demonstraram resistência a meticilina e os isolados carregavam o gene *mecA* e genes de resistência para eritromicina e tetraciclina. Conseqüentemente, a presença de cepas SCN multirresistentes a antimicrobianos encontradas em ambiente de processamento de laticínios, também é uma preocupação para a cadeia de produção de alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Em geral, a implementação das BPF é fundamental para reduzir o risco de disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos em toda a cadeia de produção (ALVES *et al.*, 2018), aliado a estudos de avaliação e monitoramento da resistência e da virulência dos isolados de estafilococos.

#### **1.4.1 Métodos para avaliação da sensibilidade antimicrobiana e identificação dos genes de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* sp.**

Vários métodos foram descritos para determinar a resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* sp. Entre os métodos fenotípicos, a técnica de disco-difusão em ágar

(meio de cultura sólido) e a microdiluição em caldo (meio de cultura líquido) são os mais comumente utilizados para realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) para cepas de origem alimentar. Entre os métodos genotípicos, destacam-se os baseados na detecção dos genes de resistência específicos (KADLEC *et al.*, 2015).

Na metodologia de disco-difusão em ágar, o crescimento da bactéria pode ser impactado dependendo do seu potencial de sensibilidade e da difusão do antimicrobiano no ágar. Como resultado, zonas de inibição de crescimento bacteriano podem aparecer com diferentes diâmetros em torno do disco impregnado com uma concentração determinada do antibiótico teste, sendo, portanto, as bactérias classificadas como sensível, resistente ou sensível aumentando a exposição (antiga classificação como resistência intermediária) ao agente antimicrobiano testado (KADLEC *et al.*, 2015).

O teste de disco difusão é um método de baixo custo, fácil de realizar e avaliar, porém, com a desvantagem que são qualitativos, ou seja, sem determinação da concentração mínima inibitória (MIC). Em contrapartida, outro teste baseado em difusão do antimicrobiano em ágar, denominado comercialmente de E-test, apresenta custo mais elevado, embora permita a determinação do MIC. No E-test, uma tira contendo um gradiente de concentração do agente antimicrobiano a ser testado é colocada sob o ágar contendo a bactéria teste. Após incubação, é possível reportar a MIC onde a zona inibitória de crescimento intercepta a tira em concentração específica do antimicrobiano do E-test.

Os métodos de diluição em caldo são testes de sensibilidade antimicrobiana que permitem a determinação do MIC e podem ser realizados em escala micro (quando em placas de microdiluição) ou macro (quando em tubos de ensaio). As bactérias podem ser classificadas como sensíveis, resistentes ou sensível aumentando a exposição aos agentes antimicrobianos testados.

Adicionalmente, o método de MALDI-TOF-MS (do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) também pode ser utilizado, em protocolos específicos, para detecção de resistência antimicrobiana, quando por exemplo, prediz se a bactéria produz enzimas que hidrolisam os antibióticos como carbapenemases e beta-lactamases de espectro estendidas (do inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*; ESBLs) (MARCH-ROSSELLÓ, 2017).

Os testes genotípicos fornecem informações sobre quais genes de resistência estão presentes no genoma de um isolado bacteriano. Em estafilococos sabe-se que diferentes genes de resistência podem estar associados a um ou mais fenótipos de

resistência, como, por exemplo, os genes de resistência *ermA*, *ermB*, *ermC* e *ermT*. Estes genes conferem resistência a macrolídeo, lincosamida e streptogramina B, podendo ocorrer sozinhos ou em diferentes combinações por isolado (WENDLANDT *et al.*, 2013).

Para detectar genes de resistência presentes no genoma, duas abordagens principais são usadas: (i) métodos baseados em amplificação de segmentos de DNA codificantes de genes de resistência (PCR e suas variações) e (ii) análise de expressão por microarranjos de DNA. A desvantagem desses métodos é que apenas as sequências de nucleotídeos conhecidas podem ser detectadas. Os métodos da abordagem (i) acima precisam ser complementares aos testes de sensibilidade fenotípicos por não apresentam informações se o gene detectado é funcionalmente expresso (KADLEC *et al.*, 2015).

Diferentes estudos realizaram a identificação de genes de resistência a antibióticos dos isolados de MRSA em amostras de leite e derivados (Tabela 4).

Tabela 4. Métodos de detecção de genes de resistência a antibióticos de isolados de *Staphylococcus* sp. em leite e produtos lácteos.

Produto	Microrganismo	Gene	Método	Referência
Leite	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	PCR	Mahanti <i>et al.</i> (2020)
Leite	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	qPCR	Parasi <i>et al.</i> (2016)
Leite	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	PCR multiplex	Titouche <i>et al.</i> (2019)
Leite	<i>S. epidermidis</i>	<i>mecA</i> e <i>blaZ</i>	PCR	Klibi <i>et al.</i> (2018)
Leite	<i>S. xylosus</i> , <i>S. epidermidis</i>	<i>mecC</i>	PCR	Paterson <i>et al.</i> (2013)
Leite bovino, ovino e caprino	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	PCR	Papadopoulos <i>et al.</i> (2019)
Leite caprino	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	PCR	Angelidis <i>et al.</i> (2020)
Leite cru e queijos	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i> , <i>erma</i> , <i>ermC</i> e <i>tetK</i>	PCR multiplex	Rodrigues <i>et al.</i> (2017)
Leite e produtos lácteos	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	PCR multiplex	Basanisi <i>et al.</i> (2017)
Queijo tipo coalho caprino	<i>S. aureus</i>	<i>blaZ</i>	PCR	Aragão <i>et al.</i> (2019)
Queijos diversos	<i>S. aureus</i>	<i>femA</i>	PCR multiplex	Ferreira <i>et al.</i> (2016)

PCR: reação em cadeia da polimerase; qPCR: PCR quantitativa em tempo real; MLST: tipagem de sequência multilocus; *spa*: tipificação do gene da proteína A estafilocócica específica de *S. aureus*; *SCCmec*: tipificação do cromossomo estafilocócico do cassete *mec*; PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado.

Strommenger *et al.* (2003) descreveram uma PCR multiplex para detecção simultânea de nove genes de resistência a antibióticos clinicamente relevantes para *S. aureus*. Os fragmentos amplificam simultaneamente *mecA* (que codifica a resistência à meticilina), *aacA-aphD* (resistência aos aminoglicosídeos), *tetK*, *tetM* (resistência à tetraciclina), *erm(A)*, *erm(C)* (resistência ao macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B), *vat(A)*, *cuba(B)* e *cuba(C)* (resistência à estreptogramina A). Ensaios de PCR multiplex proporcionam identificação rápida, simples e precisa dos perfis de resistência a antibióticos, podendo ser usados em diagnósticos clínicos e em estudos epidemiológicos de vigilância.

A detecção de genes de resistência específicos também pode ser acoplada a detecção de marcadores específicos da espécie, tal como descrito por Wang *et al.* (2014), onde a PCR multiplex em tempo real foi usada para detectar de forma simultânea sequência 16SrRNA para *S. aureus* e os genes *nuc* e *mecA* para resistência a meticilina, incorporando três sondas TaqMan específicas do alvo marcadas com diferentes fluoróforos (Cy5, HEX e FAM).

Quanto ao método de microarranjos de DNA, pode ser usado para avaliar a expressão gênica, sendo capaz de detectar um grande número de genes de resistência de forma simultânea. No entanto este teste apresenta-se consideravelmente oneroso e trabalhoso de realizar, e por isso não é realizado de rotina (KADLEC *et al.*, 2015).

### 1.5 Fatores de inibição de *Staphylococcus* sp. em queijos

Os queijos artesanais brasileiros caracterizam-se pelo uso de leite cru e em alguns casos, pelo uso de culturas iniciadoras naturais (soro-fermento), conhecidas no Brasil como “pingo”. O processo de fabricação baseia-se em técnicas tradicionais desenvolvidas através dos séculos pelos queijeiros, com influências ambientais e socioculturais (KAMIMURA *et al.*, 2019). Os queijos artesanais possuem uma microbiota diversa e complexa e o *consortium* microbiano desempenha papel importante durante a maturação com relação a biossegurança pela ação na modulação do desenvolvimento de patógenos (ALMEIDA *et al.*, 2020; PINEDA *et al.*, 2020; TILOCCA *et al.*, 2020).

Um componente importante da microbiota são as BAL que participam ativamente dos processos que definem as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas dos queijos (DE DEA LINDNER *et al.*, 2008).

Das várias interações microbiológicas presentes nos queijos, a interação entre as BAL e o *S. aureus* são as mais relevantes (SILVA *et al.*, 2020). O uso de culturas bacterianas protetoras representa uma intervenção potencial para aumentar a segurança dos produtos lácteos, sendo que a maioria dessas culturas pertencem ao grupo das BAL (ALJASIR; D'AMICO, 2020).

Aljasir e D'Amico (2020) investigaram o potencial de culturas protetoras adicionadas ao leite cru para controlar o crescimento de *S. aureus* e impedir a produção de SEs. Os resultados do estudo demonstraram que biotipos de *Hafnia alvei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* inibiram o crescimento de *S. aureus* após a produção do queijo.

A adição de culturas protetoras a produtos fermentados não requer rotulagem adicional, podendo atender à demanda atual dos consumidores por alimentos “clean label”. O biocontrole por BAL pode ser considerado uma alternativa viável ao uso de agentes químicos nos alimentos, porém, os mecanismos desse antagonismo ainda não foram completamente elucidados. Para que a estratégia de biopreservação seja bem-sucedida é crucial entender como os microrganismos-alvo, especialmente os patógenos, são afetados em níveis fenotípicos e moleculares (VIÇOSA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, algumas abordagens de microbiologia preditiva podem ser usadas para modelar as interações microbianas em matrizes reais, como por exemplo na produção de queijos artesanais feitos com leite cru (VALÍK, ACAI; MEDVEDOVÁ, 2018).

Levando em consideração os fatores intrínsecos, o pH mínimo para a multiplicação de *S. aureus* nos queijos está situado na faixa de pH próximo a 5.0. O leite cru possui pH em torno de 6.5, o que favorece o crescimento dessas bactérias, indicando que a contaminação pode ocorrer nos estágios iniciais da fabricação dos queijos, como na etapa de fermentação do leite e obtenção da coalhada, ou seja, quando as BAL autóctonas estão na fase lag e o ácido láctico ainda não foi produzido eficientemente para acidificar o meio e suprimir a multiplicação dos patógenos (ACAI *et al.*, 2014).

Na etapa inicial da maturação dos queijos, há maior prevalência de BAL, principalmente dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. A capacidade de produzir ácidos orgânicos a partir da fermentação dos açúcares, além de provocar redução do pH, altera o potencial de oxi-redução. Além disso, outros produtos como o peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas produzidas por BAL potencialmente inibem a multiplicação de patógenos (PINEDA *et al.*, 2020). Ainda,

Silva *et al.* (2020) e Yolmeh, Khomeiri e Ghaemi (2020) relataram que a presença de BAL pode ser capaz de alterar a expressão gênica de SEs em matrizes alimentares.

A concentração de sal dos queijos também pode afetar a expressão de genes de SEs. O número de *S. aureus* no queijo e a produção de SEs depende ainda de fatores como a natureza e a concentração do *consortium* microbiano, as condições de temperatura para a multiplicação favorável, em geral, entre 10 e 46°C, a atividade de água (aw) entre 0,86 e 0,99, as diversas pressões tecnológicas utilizadas na fabricação, o tipo de leite utilizado (cru ou termicamente processado), o potencial redox (-100 a +200 Mv) e as possibilidades de contaminação durante o processo (FOX, JIANG; TINOCO, 2020, AL-NABULSI *et al.*, 2020; SCHELIN *et al.*, 2011).

Óleos essenciais botânicos com propriedades antimicrobianas têm despertado o interesse para uso em alimentos como alternativa antibacteriana natural, como fonte para controlar a contaminação por bactérias multirresistentes e atender a demanda dos consumidores por alimentos seguros (ZHU *et al.*, 2021).

Zeinhom e Abed (2021) avaliaram a eficácia do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*) no controle de *S. aureus* em queijos. Os resultados demonstraram que o óleo na concentração de 2% reduziu significativamente *S. aureus* no queijo Egípcio Kareish durante o armazenamento refrigerado a 4°C por 28 dias.

Quanto a utilização de peptídeos antimicrobianos produzidos por *Staphylococcus* sp., denominados de estafilococinas, Farias *et al.* (2019) investigaram o uso potencial para prevenir e/ou reduzir a contaminação por *S. aureus* em queijo tipo Minas Frescal com teor reduzido de sódio. A atividade antiestafilocócica testada nos queijos demonstrou que três tipos de estafilococinas, aureocina A53, Pep5 e lisostafina apresentaram atividade lítica contra cepas enterotoxigênicas e com resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A lisostafina apresentou a melhor atividade inibitória, reduzindo consideravelmente o número de células viáveis. O resultado do estudo sugeriu que as estafilococinas podem ser uma alternativa viável de aplicação na indústria de queijos quanto aos aspectos de biopreservação. Contudo, a aplicação industrial requer extensa investigação quanto a segurança na aplicação destas substâncias em alimentos.

A expressão de alguns fatores de virulência pode ser dependente da densidade populacional mediada por quorum sensing (QS). Nesse sistema as células se comunicam e atuam de forma coordenada, sintetizando, detectando e reagindo a pequenas moléculas de sinalização difusíveis chamadas de autoindutores ou feromônios, de forma que o QS

pode colaborar para controlar a expressão de muitos fenótipos bacterianos indesejáveis (MACHADO *et al.*, 2020).

Em *S. aureus* e *S. epidermidis* o sistema *agr* é responsável pela regulação de proteínas de superfície e exoproteínas, algumas das quais são consideradas fatores de virulência (KIES *et al.*, 2003).

De acordo com Rul e Monnet (2015), o QS em alimentos é afetado por muitos fatores da matriz alimentar (pH, condições redox, temperatura e heterogenicidade da matriz), onde a sinalização é influenciada pela difusão, acúmulo e recepção das moléculas sinalizadoras. Estudos demonstraram que em *S. aureus* a atividade do QS (*agr*) foi extremamente reduzida quando o microrganismo foi cultivado em matriz queijo versus um caldo nutritivo de laboratório (VALIHRACH *et al.*, 2014; CRETENET *et al.*, 2011). O sistema regulatório do Qs exerceu influência na redução da expressão de SEs, especialmente no gene da SEC (*sec*) em amostras de leite e queijo. A produção das bacteriocinas (*e.g.* nisina) regulada por QS também pode ser usada como conservante natural nos alimentos (RUL; MONNET, 2015).

Outro problema importante relacionados ao QS é o aumento da resistência aos antimicrobianos, que pode resultar da formação preliminar de biofilmes, formados pelas bactérias quando a densidade populacional é favorável. Estudos demonstraram que as bactérias encontradas em biofilmes são capazes de tolerar concentrações de até 1000 vezes maiores de antimicrobianos em comparação com suas correspondentes células plactônicas (OLSEN, 2015). Antibióticos atualmente disponíveis contra bactérias multirresistentes têm efeito limitado na inibição de biofilme (WU *et al.*, 2014).

Os bloqueadores de QS são propostos como novos promissores agentes para terapia antimicrobiana, especialmente para o tratamento de infecções com cepas multirresistentes de *S. aureus*. Todavia, vale ressaltar que a inibição da sinalização do QS não se objetiva a eliminar o microrganismo, mas a bloquear a expressão do gene alvo, diminuindo a virulência das células e tornando-as mais vulneráveis a resposta imune do hospedeiro (SAEKI *et al.*, 2020).

De acordo com Xie *et al.* (2019), as interações entre o peptídeo indutor (AIP) e *AgrC* (histidina proteína quinase) ativam a virulência em *Staphylococcus*, enquanto os pares não cognatos, geralmente apresentam efeito inibitório. Contudo, explorar o *Agr* para o desenvolvimento de novas terapias depende da compreensão de todos os mecanismos subjacentes e o agonismo e antagonismo da sinalização dos dois componentes em todas as fases do processo de sinalização.

A compreensão da comunicação química entre as bactérias nos alimentos ainda está sendo investigada, entretanto, apesar de representar um campo de pesquisa com muitos desafios, contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias contra as toxinfecções bacterianas.

## 1.6 Considerações finais

A produção de queijos artesanais no Brasil representa importância econômica e cultural, o que explica os esforços para garantir sua qualidade. Os queijos artesanais brasileiros produzidos a partir de leite cru são produtos cada vez mais apreciados e consumidos, devendo-se direcionar todos os esforços possíveis para garantir sua segurança microbiológica. Embora existam relatos de surtos devido ao consumo de derivados de leite cru, no Brasil, informações epidemiológicas sobre o assunto são escassas. Como mencionado anteriormente, *S. aureus* é um dos principais patógenos encontrados em queijos artesanais produzidos com leite cru, no entanto, informações referentes as características destes nessa matriz e sua origem na cadeia produtiva são limitadas.

O Brasil possui extensa legislação que contempla normas sanitárias e de BPF para queijos artesanais. A Instrução Normativa nº 161 de 1º de Julho de 2022 da ANVISA preconiza a análise de SEs, onde o limite de detecção do método para SEs deve ser menor ou igual a 1 ng/g, devendo estar ausente nos queijos considerados seguros para o consumo. A Comunidade Europeia (CE) adotou uma legislação que define os critérios microbiológicos para alimentos com enumeração de SCP e detecção de SEs.

A avaliação de risco referente à contaminação por *S. aureus* em queijos na CE é baseada na quantificação de SCP nos queijos fabricados com leite cru, onde prevê-se que o número de estafilococos seja mais elevado. Caso os resultados sejam superiores a valores acima de 5 log<sub>10</sub> UFC/g, o lote deverá ser testado para análise de detecção de SEs. Portanto, para garantir a segurança dos alimentos, é necessário determinar a concentração de células de *S. aureus* e limitar a potencial produção de SEs durante o processo de produção de queijos.

As boas práticas de manejo e ordenha e as BPF são ferramentas eficazes para prevenir a presença de patógenos nos queijos artesanais. Para a aplicação efetiva dessas práticas, auditorias e treinamento periódico devem ser compulsórios para todos os envolvidos na cadeia de produção. Por fim, considerando a emergência em saúde pública

que a resistência aos antimicrobianos representa, recomenda-se uma abordagem de Saúde Única como estratégia de estudo e de prevenção de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos na cadeia de produção de queijo artesanal de leite cru no Brasil.

## **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E PREVALÊNCIA DE GENES CODIFICANTE DA TOXINA LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE (PVL) EM ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS* SP. NO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL DIAMANTE**

**Resumo:** O gênero *Staphylococcus* sp. é um dos mais frequentemente encontrados em queijos de leite cru. Algumas espécies do gênero são mundialmente reconhecidas por causar infecções em humanos e animais. Além disso, as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são produzidas por algumas cepas de *S. aureus* que contaminam os alimentos, sendo responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica, quando ingeridas em alimentos contaminados. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar molecularmente cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de amostras de queijo artesanal, avaliar o perfil de resistência fenotípica aos antibióticos, avaliar a presença das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) nas amostras de queijo e a presença de genes codificantes de virulência nos isolados. Foram obtidos 57 isolados de *S. aureus* entre as amostras. Não foi detectada a presença de enterotoxinas nas amostras de queijos, nem dos genes codificantes de enterotoxinas nos isolados. Entretanto, o gene codificante da toxina Leucocidina Panton-Valentine (PVL) foi encontrado em 8 isolados (38,9%). O *agr* tipo I foi o mais encontrado (61,90%), seguido pelo *agr* tipo II (23,81%). Foram identificados dez tipos diferentes de *spa* (t1451, t002, t189, t2734, t105, t518, t17308, t11712, t127, t521). Nos testes de suscetibilidade antimicrobiana, a maior parte dos isolados apresentou resistência à penicilina (33,33%), seguida pela clindamicina (28,07%), eritromicina (26,31%) e tetraciclina (22,80%). Dos isolados testados, doze (21,05%) demonstraram resistência induzível à clindamicina, incluindo nove isolados multirresistentes. Essas evidências enfatizam a presença de patógenos multirresistentes na cadeia produtiva do queijo artesanal e a necessidade de realização de análise de risco, melhorias no monitoramento e controle de qualidade, para prevenir a contaminação e disseminação de cepas de *S. aureus* resistentes.

**Palavras chaves:** Caracterização molecular, resistência antimicrobiana, enterotoxinas estafilocócicas, saúde pública.

## 2.1 Introdução

O queijo colonial artesanal Diamante é produzido na comunidade rural denominada Diamante no Município de Major Gercino, localizado na região serrana da grande Florianópolis, Santa Catarina. O queijo Diamante é um queijo de massa semicozida elaborado com dois ingredientes: sal e coagulante (quimosina), sendo produzido a partir de leite recém ordenhado ou pela mistura do leite refrigerado da ordenha do dia anterior com o leite da primeira ordenha do dia seguinte. O processo de salga é realizado diretamente sobre a massa, após a retirada do soro. Os queijos são prensados manualmente com o auxílio de tecidos e colocados em formas de madeira de cedro de formato retangular de tamanhos variados. A maturação (cura) é feita em temperatura ambiente sobre prateleiras de madeiras nativas, onde os queijos são virados e lavados periodicamente em água corrente. Esse período é relativamente curto (15 a 40 dias), variando conforme a demanda do mercado no qual será comercializado (SLOW FOOD BRASIL, 2020).

O queijo artesanal Diamante possui casca amarela, textura macia, sabor suave e pequenas olhaduras presentes na massa provenientes da ação de bactérias propiônicas que conferem ao alimento sabor amendoado, além das qualidades nutricionais e fisiológicas que proporcionam ao produto sua notoriedade (DEGENHARDT *et al.*, 2023).

A fabricação de queijos de leite cru é considerada uma tarefa desafiadora, sendo essencial uma alta qualidade microbiológica da matéria-prima para a subsequente transformação em queijo. Neste tipo de produção é fundamental o equilíbrio da ação microbiológica entre as bactérias benéficas que irão contribuir para as características sensoriais e de conservação e aquelas com características deteriorantes e/ou patogênicas que podem colocar em risco a segurança dos alimentos (ARIAS-ROTH *et al.*, 2022).

Dentre os patógenos mais frequentemente encontrados em queijos de leite cru, destaca-se o gênero *Staphylococcus* sp., capaz de induzir infecções agudas e crônicas em homens e animais. Estas bactérias são consideradas como principais patógenos responsáveis pela mastite bovina em todo mundo (ABEBE *et al.*, 2016; ARIAS-ROTH *et al.*, 2022).

No Brasil, aproximadamente 95% das mastites são causadas por microrganismos, tais como: *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*

(KUHNNEN *et al.*, 2021). De forma tal que essas espécies são reservatórios potenciais para abrigar genes de resistência que podem transferir espécies de estafilococos nos ambientes agrícolas e conseqüentemente para os produtos derivados (SCHOENFELDER *et al.*, 2017; VÝROSTKOVÁ *et al.*, 2022). Assim sendo, *S. aureus*, com diferentes fenótipos de resistência a antibióticos podem causar contaminação cruzada (CAI *et al.*, 2021).

Os antibióticos são compostos amplamente utilizados para tratar infecções bacterianas em humanos e animais, como também são usados em atividades agrícolas (THAPA; SHRESTHA; ANAL *et al.*, 2020). Os antimicrobianos são moléculas com capacidade de inibir ou inviabilizar bactérias (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019). Em geral, a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno que ocorre naturalmente ao longo do tempo, devido aos processos de alteração genética decorrente de mutações e seleção (transferência vertical de genes) e de aquisição de genes entre cepas e espécies (transferência horizontal de genes) (BISWAS; RAOULT; ROLAIN, 2008).

Portanto, o uso acentuado de substâncias antimicrobianas em fazendas pode favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes aos antibióticos, o que representa um desafio para a saúde pública, tendo em vista que esses animais podem agir como reservatórios para abrigar os patógenos com genes de resistência e com capacidade de transmiti-los por meio do consumo dos produtos alimentícios, o que pode resultar na disseminação mais ampla de cepas resistentes (DA SILVA ABREU *et al.*, 2021). Particularmente, o MRSA é o principal patógeno que apresenta maior virulência e resistência a diferentes tipos de antibióticos (BACURDI *et al.*, 2019).

O teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) é o método tradicional para avaliar a resistência antimicrobiana em bactérias, esses testes são baseados em culturas que determinam o quanto as bactérias podem crescer na presença dos antimicrobianos, sendo um teste extensamente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica hospitalar. Fornece informações da resistência fenotípica de forma a orientar as decisões de tratamento para os pacientes (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

No Brasil, a Portaria n° 64 de 11 de dezembro de 2018 preconiza que todos os laboratórios da rede pública e privada utilize as normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) presente nos documentos da versão brasileira do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), denominado BrCAST. Essa portaria tem como objetivo a padronização e melhorias na interpretação

dos resultados para melhorar a vigilância epidemiológica e clínica no país (BRASIL, 2018).

Além da resistência a antibióticos, *S. aureus* produz toxinas que causam intoxicação alimentar através da ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas pré-formadas nos alimentos por cepas enterotoxigênicas (SALGADO-PABÓN; TRAN, 2021). A intoxicação alimentar por SEs, embora autolimitada, é aguda e uma das DTA mais prevalentes no mundo (HENNEKINNE *et al.*, 2018). Nesse contexto, os surtos por intoxicação alimentar estafilocócica continuam sendo uma questão importante para os programas globais de saúde pública, com impacto consideravelmente importante também do ponto de vista econômico (SALGADO-PABÓN; TRAN, 2021).

No Brasil, o consumo de leite e seus produtos derivados, especialmente queijo produzido com leite cru é a causa de muitos surtos de DTAs (HENNEKINNE *et al.*, 2018; HUMMERJOHANN *et al.*, 2014; JOHLER *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017). Os processos de produção desses queijos são naturalmente suscetíveis a contaminação por microrganismos. A fonte de contaminação por *S. aureus* pode ser ubiqüitária, ou seja, a partir do leite cru, do ambiente de processamento e dos manipuladores de alimentos (ARCURI *et al.*, 2010). A presença de *S. aureus* em queijos de leite cru pode indicar a ausência de condições higiênicas sanitárias adequadas durante a produção e manuseio do produto. Em acordo com essa informação, Arias-Roth *et al.* (2022) mencionam que um dos patógenos mais frequentemente encontrados em queijos de leite cru é o *S. aureus* produtor de enterotoxinas.

*S. aureus* é o terceiro agente etiológico mais associado a surtos de origem alimentar, representando 9,4% dos casos notificados (SVS, 2019). Para ilustrar a situação no Brasil, alguns estudos já detectaram a presença de enterotoxinas ou genes produtores de enterotoxinas em isolados de *S. aureus* provenientes de queijos artesanais (BORGES *et al.*, 2008; VERAS *et al.*, 2008; GRECELLE *et al.*, 2020).

As técnicas de biologia molecular auxiliam no estudo da associação entre surto e agente causador com maior precisão, além de fortalecer e refinar os dados epidemiológicos, o que proporciona entendimento mais específico (FOXMAN; RILEY, 2001). Os resultados obtidos através de análises moleculares corroboram com as atividades epidemiológicas como vigilância e investigação de surtos de intoxicação alimentar por SEs, identificação de vias de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente não relacionados, bem como a caracterização de interações hospedeiro-

patógeno. Assim, essas práticas levam ao melhor entendimento da patógenese das doenças (FOXMAN; RILEY, 2001; DA SILVA CÂNDIDO *et al.*, 2020).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade a antibióticos de *Staphylococcus* sp. potencialmente resistentes, identificar as cepas isoladas dos queijos artesanais do tipo colonial Diamante através da análise de MALDI-TOF e analisar a presença de enterotoxinas e/ou de genes codificadores de virulência, além de realizar a caracterização molecular dos isolados.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1 Obtenção das amostras, identificação fenotípica e enumeração de *Staphylococcus* sp.

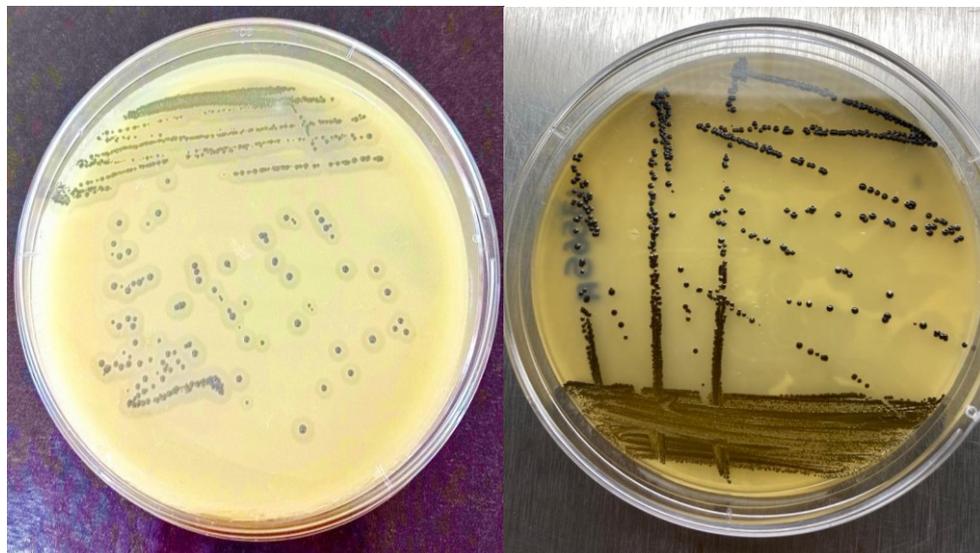
As amostras de queijo artesanal colonial Diamante (duas peças inteiras de +/- 2 kg de cada produtor) foram coletadas em quatro queijarias da região produtora (latitude 27°25'05" Sul; longitude 48°57'05" Oeste) nos tempos um, sete e 15 dias de maturação (T1, T7 e T15).

Para a análise microbiológica, 25g de queijo foram homogeneizados em 225 mL de água tamponada estéril, utilizando sacos plásticos do tipo stomacher, por um período de 60 segundos. Em seguida, foram preparadas três diluições seriadas com solução salina (0,85%) para a contagem dos *Staphylococcus* sp. nas amostras. A contagem e isolamento foram realizados em ágar Baird-Parker (BPA) (Neogen, Lansing, MI, USA), suplementado com emulsão concentrada estéril de gema de ovo e telurito de potássio (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), conforme a metodologia oficial da ABNT NBR ISO 6888-1 (ABNT, 2016). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as colônias foram enumeradas e o número de células de *Staphylococcus* sp. foi calculado e multiplicado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC/g). Em seguida, um total de três colônias presumíveis de *S. aureus* foram isoladas de cada placa de diluição. As colônias típicas foram identificadas por sua morfologia (típica: circular, lisa, convexa, cinza a preta, com margem clara circundada por dois halos: um opaco e outro claro; e as atípicas: colônias cinzentas a pretas, sem zonas transparentes ou opacas) (Figura 1).

No total foram selecionados 116 isolados presumíveis de *Staphylococcus* sp., os quais foram posteriormente submetidos ao teste de coagulase. Os isolados foram

conservados em microtubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI). Acrescentou-se glicerol a 20% e os isolados foram criopreservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

Figura 1. Colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* sp. em ágar Baird Parker (BPA)



Fonte: Autora

### 2.2.2 Teste de Confirmação Bioquímico da Coagulase

Os 116 isolados presumíveis de *Staphylococcus* sp. foram reativados em caldo de infusão cérebro coração (do inglês *Brain Heart Infusion broth* - BHI) (Himedia, Milano, Itália) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. A partir daí foram adicionados assepticamente em tubos esteréis 0,1 mL de cada cultura obtida em caldo BHI a 0,3 mL de plasma de coelho (Larboclin, Brasil) seguido de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , conforme especificações do fabricante do plasma. Após 4 h de incubação, foi verificado se houve coagulação do plasma. Nos casos negativos após 4 h, a observação foi realizada em até 24 h. Foram considerados positivos os tubos nos quais houve a formação de coágulo. Como controle negativo do teste foram adicionados 0,1 mL de caldo BHI sem inóculo a 0,3 mL de plasma de coelho com incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  (ABNT, 2016).

### 2.2.3 Identificação por análise de MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer).

A identificação dos isolados de *S. aureus* foi confirmada utilizando a técnica de MALDI-TOF (do inglês - *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*), em colaboração com o Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio

de Janeiro (UFRJ). Inicialmente, as amostras previamente identificadas como *S. aureus* através do teste bioquímico de coagulase foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar TSA, pela técnica do esgotamento em ágar, e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por até 48 horas antes do procedimento de análise. As amostras foram preparadas por transferência direta estendida da seguinte forma: colônias bacterianas foram colhidas e depositadas (em duplicata) nos alvos de uma placa de aço polido, sendo aplicado  $1\mu\text{l}$  de ácido fórmico a 70% (v/v), e após a secagem,  $1\mu\text{l}$  da solução matriz (HCCA; alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). Foi utilizada a cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* como padrão para calibração e espectro de referência do equipamento. O processamento dos espectros das proteínas entre 2 e 20 kDa foi obtido através do software flexControl versão 3.4 (Bruker Daltonics, EUA) e comparado com os espectros presentes nas bibliotecas MBT BDAL 12.0, MBT Mycobacteria Library 7.0 e MBT Filamentous Fungi Library 5.0 do software MBT Compass versão 4.1 (Bruker Daltonics).

Os parâmetros adotados para interpretação dos resultados obtidos pela técnica de MALDI-TOF foram os seguintes: a) A identificação foi considerada de grande fiabilidade (consistência da espécie) quando a pontuação variou de 2.00 a 3.00; b) A identificação foi de baixa fiabilidade (consistência do gênero) quando a pontuação variou de 1.70 a 1.99; c) A identificação foi classificada impossível (sem consistência) quando a pontuação foi inferior a 1.69.

## 2.2.4 Teste de sensibilidade aos antibióticos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos 57 isolados de *S. aureus* foi realizado pelo método de Kirby-Bauer de difusão em disco, de acordo com os protocolos e tabelas do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2021). Esse método consiste na suspensão direta das colônias em solução salina 0,9% (p/v) de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão é preparada a partir de um crescimento de 18-20 h das amostras no meio de cultura ágar Mueller-Hinton a  $35^\circ\text{C}$ , inoculados pela técnica de esgotamento em ágar. A densidade óptica da suspensão bacteriana do inóculo foi conferida através de espectrofotometria, num comprimento de onda de 625 nm, na qual a suspensão apresentou uma absorbância na faixa de 0,08 a 0,10. Em seguida, com o auxílio de um swab estéril, o inóculo foi espalhado uniformemente

em três direções sobre a superfície de uma placa com meio de cultura ágar Mueller-Hinton.

Em seguida, os discos foram posicionados nas placas de ágar Muller Hinton (Kasvi, Itália) com o auxílio de uma pinça estéril. As placas inoculadas foram incubadas a 36°C por 18/24 h, conforme indicado nas normas preconizadas pelo BrCAST para cada disco de antibiótico. A zona do halo de inibição foi então registrada com o auxílio de um paquímetro, sendo caracterizada como o diâmetro da zona ao redor do disco em que não houve crescimento bacteriano. Com base nisso, os isolados foram definidos como “resistentes”, “sensível aumentando a exposição” e “sensíveis” de acordo com as diretrizes dos padrões interpretativos dos diâmetros de halos de inibição das tabelas do BrCAST (BrCAST, 2021).

Nos experimentos foram utilizados 11 discos de antibióticos (Larboclin, Brasil), com concentração correspondente a: penicilina G (10 U), cefoxitina (30 µg), tetraciclina (30 µg), linezolida (10 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), sulfazotrim (25 µg) e ceftalorina (5 µg). A resistência à metilina foi detectada pelo método de difusão em disco de cefoxitina, e a resistência induzível à clindamicina pelo teste de aproximação de disco de eritromicina e clindamicina (teste D). Cada isolado foi avaliado em duplicata, e o controle de qualidade foi realizado através da realização do TSA na cepa controle de *S. aureus* ATCC 29213.

### **2.2.5 Detecção das enterotoxinas nas amostras de queijo artesanal**

A presença de enterotoxinas nas amostras de queijos artesanais foi realizada pelo método de imunoenensaio automatizado, baseado no princípio de teste de antígeno fluorescente ligado a enzimas (do inglês *Enzyme Linked Fluorescent Ensaio* - ELFA - VIDAS® Staph enterotoxin II, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE. Nesse método, os anticorpos policlonais complementares são direcionados para as cinco diferentes enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE onde são usados para o processo de captura e detecção, porém sem distinguir as toxinas individualmente.

Neste estudo, oito amostras de queijo artesanal foram preparadas de acordo com o protocolo de preparação das amostras do método VIDAS® Staph enterotoxin II para produtos lácteos. Para obtenção dos extratos para as análises de enterotoxinas

estafilocócicas no queijo, as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Em seguida, foram pesadas 25g de amostra de queijo, homogeneizadas e adicionadas de 40 mL de água desmineralizada pré-aquecida a 38°C. Após essa etapa, foi realizada a homogeneização da mistura durante três minutos, até obter uma suspensão homogênea, deixando em repouso durante 30 minutos a 18-25°C. Antes de proceder com a etapa de centrifugação, o pH da suspensão foi ajustado entre 3,5 e 4,0 com ácido clorídrico (HCl) 5 mol/L. Após o ajuste de pH, as suspensões foram centrifugadas a 3000-5000 g, a temperatura de 18°C por 15 minutos. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e o seu pH ajustado entre 7,5 e 8,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. Em seguida, uma outra centrifugação do extrato foi realizada a 3000-5000 g, a temperatura de 18°C durante 15 minutos. Após a segunda centrifugação e filtração, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi adicionado aos poços iniciais da tira VIDA, e submetida ao exame do leitor de ELFA a 450 nm. As amostras que apresentaram resultado correspondente ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência relativa do padrão, de VT inferior a  $< 0,13$  foram consideradas negativas e aquelas que apresentarem valores de  $VT \geq 0,13$  foram consideradas positivas, onde VT é a relação entre a fluorescência relativa do padrão e a fluorescência relativa da amostra (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

## **2.2.6 Detecção dos genes de virulência em *S. aureus***

### **2.2.6.1 Origem das cepas controles**

As cepas controles portadoras dos genes codificantes das enterotoxinas utilizadas na presente pesquisa foram doadas pelo pesquisador doutor Ricardo Souza Dias da Fundação Ezequiel Dias – Laboratório de Enterotoxinas – LACEN.

### **2.2.6.2 Extração de DNA**

O isolamento do DNA das cepas de *S. aureus* foi realizado utilizando o método de extração com NaCl, conforme descrito por Abrão *et al.* (2005), com algumas adaptações. Para cada placa contendo os isolados, foram coletadas cinco colônias que foram solubilizadas em 400 µl de tampão de lise TES (solução contendo Tris-HCL 1M, SDS 20% (v/v) e EDTA 0,5M). Posteriormente, os isolados foram submetidos a 100°C

por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 2,5 µl de proteinase K (20 mg/mL) e incubou-se em banho-maria a 42°C por 1 hora.

Após a incubação, adicionou-se 84 µl de NaCl saturado (6 M), e agitou-se no agitador de tubos (vórtex). Os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 14.000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foi adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado, agitando-se os microtubos, que foram, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. O etanol absoluto foi descartado e, em seguida, adicionou-se 1000 µl de etanol 70%, invertendo-se os microtubos várias vezes para lavar o sedimento (*pellet*). Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 14.000 rpm, e o sobrenadante descartado. Repetiu-se a lavagem com 1000 µl de etanol absoluto e centrifugou-se mais uma vez por 5 minutos a 14.000 rpm. Após descartar o sobrenadante, os microtubos foram acondicionados abertos em estufa a 60°C até a evaporação completa do etanol residual (cerca de 10min). Por fim, o DNA foi solubilizado em 50 µl de água ultrapura e armazenado a -20 °C para ser usado nas análises posteriores.

O DNA dos isolados de *S. aureus* foi submetido à análise de PCR (reação em cadeia da polimerase) para amplificação dos genes codificantes das enterotoxinas clássicas (A-E), genes da Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) e toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

A confirmação da espécie e da integridade do DNA foram realizadas pela amplificação do gene da termonuclease (*nuc*), específico para *S. aureus*. Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para amplificar esses genes são descritos na Tabela 5.

Tabela 5. *Primers* usados para detectar os genes de enterotoxinas, leucocina panton valentine (*lukS-lukF*) e toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

<i>Primer</i>	Gene	Sequence (forward/ reverse)	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon	Referência	Cepa controle
SEA-F	<i>sea</i>	5'-GACTTGTATGGTGCTTATTATG-3'	55	361	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	ATCC 13565
SEA-R		5'-AATACTGTCCTTGAGCACCA-3'				
SEB-F	<i>seb</i>	5'-GCTGATAAATAACAAAGATAAAT ACG-3'	55	336	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	ATCC 14458
SEB-R		5'-ATCCCGTTTCATAA GGCGAG-3'				
SEC-F	<i>sec</i>	5'-GTAAAGTTACAGGTGGCAA AACTTG-3'	55	297	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	ATCC 19095
SEC-R		5'-CATATCATACCA AAAAGTATTGCCGT-3'				
SED-F	<i>sed</i>	5'-GAATTAAGTAGTACCGCGCTA-3'	55	491	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	ATCC 23235
SED-R		5'-GCTGTATTTTCCTCCGAGAGT-3'				
SEE-F	<i>see</i>	5'-CTGAAAACAAAGAGAGTGATG-3'	57	379	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	ATCC 27664
SEE-R		5'-GTGTAAATAATGCCTTGCCTGAA-3'				
p152	<i>tst</i>	5'-ATCGTAAGCCCTTTGTTG-3'	55	334	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	Mu50
p154		5'-TGGATATAAGTTCCTTCGC -3'				
PLV-F	<i>lukS-</i>	5'ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3'	55	433	Guimarães <i>et al.</i> (2015)	MRSA 17005
PVL-R	<i>lukF</i>	5'-GCATCAAGTGTA TTGGATAGCAAAGC-3'				
NUC-F	<i>nuc</i>	5'-GCGATTGATGGTGATACGGT-3'	55	279	Shahid <i>et al.</i> (2021)	ATCC 13565
NUC- R		5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'				

### 2.2.6.3 Amplificação dos genes por PCR

A reação de amplificação dos genes de interesse de *S. aureus* foi realizada contendo 1 µl de cada *primer forward* e *reverse* (10 pmol/µl), 12,5 µl de master mix GoTaq® Green (M7122; Promega, Madison, EUA), 5 µl de DNA e 5,5 µl de água livre de nuclease, para um volume máximo de reação de 25 µl. Água livre de nuclease estéril foi adicionada em vez de ácidos nucleicos para o controle negativo. Os tubos de PCR contendo a mistura foram transferidos para o termociclador Applied Biosystems Veriti 96-well.

O programa de amplificação dos genes codificantes das enterotoxinas e dos genes da toxina 1 do choque tóxico e leucocidina de Pantón-Valentine foi realizado sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, temperatura de anelamento variava de 55°C a 57°C por 30 segundos de acordo com cada *primer* (Tabela 5), extensão a 72°C por 1 minuto por ciclo e uma extensão final a 72°C por 4 minutos. O ciclo foi repetido 35 vezes. Os controles positivos utilizados foram: ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) 27664 (*see*), Mu50 (*tst*) e 17005 (*lukS-lukF*).

O programa de amplificação para o gene *nuc* foi realizado sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de desnaturação a 94°C por ciclo, temperatura de anelamento a 55 °C por 30s, extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. O ciclo foi repetido por 37 ciclos. O controle positivo da reação foi a cepa ATCC 13565 (*sea*) e o controle negativo foi realizado com água estéril, conforme descrito por Feysa *et al.* (2023).

### 2.2.6.4 Eletroforese em gel e visualização

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) na concentração 1X, por 50 minutos a 110 volts e uma amperagem de 400mA. Foi aplicado um padrão de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio a uma concentração final de 10x e, posteriormente, visualizados sob luz UV no transiluminador modelo L-Pix EX da Loccus, para análise do tamanho dos fragmentos.

### 2.2.6.5. Tipagem molecular de *agr*

Todos os isolados de *S. aureus* que apresentaram perfil de resistência nos testes de suscetibilidade antimicrobiana foram submetidos à tipagem do locus *agr*. Os quatro possíveis alelos do locus *agr* em *S. aureus* (*agr* I, *agr* II, *agr* III e *agr* IV) foram identificados por meio de PCR, usando os *primers* e condições conforme descritos por Shopsin *et al.* (2003), mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. *Primers* e as condições da reação para tipagem do locus *agr*.

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	pb	Condições da reação
<i>Agr</i> I	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440	
Pan- <i>agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
<i>Agr</i> II	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572	94 °C/1minuto 55 °C/ 1 minuto 72°C/ 1 minuto } 25 ciclos
pan- <i>arg</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
<i>Agr</i> III	CTGTTGAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406	
pan- <i>arg</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		
<i>Agr</i> IV	CGATAATGCCGTAATACCCG	588	
pan- <i>arg</i>	ATGCACATGGTGCACATGC		

Fonte: Shopsin *et al.* (2003).

O DNA extraído para detecção dos genes de virulência nos isolados de *S. aureus* foi utilizado para a tipagem *agr* e *spa*. As reações de amplificação dos fragmentos do genes *agr* foram realizadas contendo 5µL de Buffer 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5 µL de desoxinucleotídeo (dNTP) (10 mM), 0,25 µL de Taq Polimerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 4 µL de DNA, 1 µL de cada primer (10pmol), e 11,25 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada, para completar um volume final de 25 µL. Foram utilizados como controles positivos as cepas de *S. aureus* COL (*agr* I), N315 (*agr* II) e MW2 (*agr* III) e C10E4 (*agr* IV).

O programa de amplificação para os genes *agr* foi realizado sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de desnaturação a 94°C por 1 minuto ciclo, temperatura de anelamento a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. O ciclo foi repetido 25 vezes.

### 2.2.6.6 Tipagem do gene *spa*

As cepas foram caracterizadas quanto ao tipo *spa* através da amplificação por PCR do fragmento variável da região polimórfica do gene *spa* (Tabela 7), seguida de purificação do produto.

Tabela 7. Sequência dos *primers* e as condições da reação para tipagem da região *spa*.

Sequência (5'→3')	pb	Condições da reação
TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	Variável	80° C/5 minutos
		94° C/45 segundos
60° C/ 45 segundos		
72° C/ 90 segundos		
CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		35 ciclos
		72° C/ 10 minutos

Fonte: RIDOM, 2014.

As reações de amplificação do fragmento do gene *spa* foram realizadas contendo 10µL de Buffer 5X, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µL de desoxinucleotídeo (dNTP), 2 µL de cada primer (10pmol), 0,5 µL de Taq Polimerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 8 µL de DNA molde e 21,5 µL água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) para um volume final de 50 µL. O produto amplificado foi observado por eletroforese em gel de agarose e os amplicons foram visualizados em um transluminador para confirmar uma amplificação específica do gene *spa*. Em seguida foi realizada a purificação, para remoção de resíduos de *primers*, sais e enzima Taq polimerase.

Para a purificação foram adicionados ao produto da reação 60 µl de isopropanol 75% à temperatura ambiente. Seguiu-se incubação por 20 min/temperatura ambiente e centrifugação por 20 min/13500 rpm/4°C. O sobrenadante foi descartado e a seguir foram adicionados 500 µl de etanol 70 %. Procedeu-se a nova centrifugação por 15 min/13500 rpm/4°C. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi seco por aproximadamente 2 horas/37°C e, em seguida, foi ressuscitado em 20 µl de água Miliq esterilizada. Em seguida as amostras purificadas de DNA com concentração de 20 ng/µl foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger, em serviço terceirizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), localizado na

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Os tipos de *spa* foram identificados a partir das repetições, utilizando as bases de dados disponíveis em <http://spa.ridom.de/repeats.shtml> e <http://spa.ridom.de/spatypes.shtml>, respectivamente.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Enumeração de *Staphylococcus* sp. e detecção de Enterotoxinas em amostras de queijo artesanal

As SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) não foram identificadas em nenhuma das oito amostras de queijo analisadas. Os resultados obtidos estão em conformidade com o que é estipulado pela legislação brasileira, especificamente a Instrução Normativa 161, de 1º de julho de 2022, a qual exige a ausência de enterotoxinas em amostras de queijo.

No entanto, sete amostras de queijo, das quatro queijarias dos produtores amostradas, no tempo de um dia e sete dias de maturação, apresentaram contagens de Estafilococos coagulase positivo/g de queijo acima do permitido pela legislação (Instrução Normativa nº 161, 2022) que estabelece o limite microbiológico de 3 log UFC/g (BRASIL, 2022) (Tabela 8). Somente o produtor C apresentou valor de contagem inferior ao permitido no tempo 7 dias de maturação. Nas amostras do 15º dia de maturação não foram detectadas contagens de estafilococos coagulase positivo.

Tabela 8. Contagens (média) de estafilococos coagulase positivo (log UFC/g) nas amostras de queijo artesanal colonial Diamante com diferentes períodos de maturação (1, 7 e 15 dias).

Produtor	Queijo (dia 1)	Queijo (dia sete)	Queijo (dia 15)
A	3,0 x 10 <sup>3</sup>	3,9 x 10 <sup>3</sup>	n.d
B	5,0 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	n.d
C	2,0 x 10 <sup>3</sup>	n.d.	n.d
D	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	n.d

n.d.: não detectado.

A presença de *Staphylococcus* sp. representa um risco potencial para saúde pública, pois, em condições favoráveis de crescimento, os estafilococos enterotoxigênicos podem crescer, produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar nos consumidores (NOURI *et al.*, 2018). Conforme relatado por Santana *et al.* (2010), a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos é possível apenas quando a população de *S. aureus* atinge ou excede  $10^5$  UFC/g no alimento.

Contudo, é importante destacar que o crescimento de *S. aureus* e a síntese de enterotoxinas estão condicionados a diversos fatores, tais como: a presença de cultura *starter*, temperatura, teor de sal, valores de pH, atividade de água (*aw*), pressão atmosférica e características nutricionais da matriz (VALERO *et al.*, 2009).

### 2.3.2 Identificação dos isolados

A partir das colônias isoladas do BPA dos queijos, o teste bioquímico da coagulase nos isolados demonstrou que 49,14% (57/116) das amostras foram classificadas como coagulase positiva e 50,86% (59/116) como coagulase negativa.

A técnica MALDI-TOF MS foi empregada para identificar a espécie das cepas isoladas das amostras de queijos. Nesse processo, foram identificados 86 isolados, pertencentes a seis espécies distintas. Destas, *S. aureus* (66,28%) e *Enterococcus faecalis* (15,12%) destacaram-se como as espécies mais prevalentes, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Identificação de cepas isoladas de amostras de queijo artesanal Diamante.

Espécie	Número de cepas	Percentual (%)	Pontuação média MALDI-TOF
<i>Staphylococcus aureus</i>	57	66,28	2.48
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	1,16	2.06
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	15,12	2.45
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	9	10,46	2.37
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	3	3,49	2.16
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	3,49	2.16
Total	86	100	-

A alta prevalência de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* pode ser considerado um indício de comprometimento da segurança microbiológica dos queijos e de práticas higiênicas sanitárias inadequadas (CAMARGO *et al.*, 2021). Além disso, algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas que podem contaminar os produtos lácteos e causar intoxicação alimentar nos consumidores (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

Outro estudo de Aragão *et al.* (2022) demonstrou a presença de isolados de *Staphylococcus spp.* em 62,20% (69/111) e *Enterococcus spp.* 11,60% (13/111) na cadeia produtiva de queijos artesanais no Brasil. Essas descobertas ressaltam a importância de medidas rigorosas de boas práticas de fabricação para garantir a qualidade e segurança microbiológica dos queijos artesanais.

As identificações por MALDI-TOF e o teste bioquímico da coagulase apresentaram concordância para *S. aureus*. Entre os 86 isolados, 57 deles (66,28%) obtiveram identificações compatíveis por ambos os métodos. No entanto, em 30 isolados, o sistema Biotyper não forneceu identificações confiáveis devido a pontuações insuficientes.

A pontuação média para os isolados identificados como *S. aureus* no MALDI-TOF foi de 2,48 (Tabela 9). Isso sugere, de acordo com o fabricante Bruker Daltonics, uma identificação confiável a nível de espécie microbiana ([www.bruker.com/microbiology](http://www.bruker.com/microbiology)). A importância das pontuações no sistema MALDI Biotyper, conforme destacado por Zhu *et al.* (2015), desempenha um papel crucial na identificação de um isolado, onde uma pontuação mais alta indica um nível de confiança e precisão de identificação superior. MALDI-TOF MS distingue picos de proteínas de microrganismos, diferenciando espectros ou assinaturas de extratos celulares e células inteiras, portanto esse método viabiliza a identificação direta de cepas bacterianas em termos de gênero e espécie, representando uma alternativa econômica aos ensaios fenotípicos e bioquímicos tradicionais (DENDANI CHADI *et al.*, 2022).

Foram identificados ainda isolados de *Raoultella ornithinolytica* e *Klebsiella oxytoca* pertencentes à ordem Enterobacterales (Tabela 9). A presença de bactérias dessa ordem pode ser indicativa de condições deficientes de saneamento e práticas inadequadas de higiene durante a ordenha dos animais leiteiros e fabricação dos queijos (VERDIER-METZ *et al.*, 2009; TABLA *et al.*, 2016).

A presença de isolados de *Macroccoccus caseolyticus* indica possíveis questões de saúde nos rebanhos, pois embora não seja classificado como um patógeno humano, é reconhecido como um patógeno infeccioso relevante na medicina veterinária (RAMOS; VIGODER; NASCIMENTO, 2021; ARAGÃO *et al.*, 2022). *Staphylococcus chromogenes* foi citado como um microrganismo reconhecido por sua tendência em causar infecções intramamárias persistente em bovinos, reforçando a importância da vigilância e manejo adequado da saúde dos animais (HAW *et al.*, 2023).

### 2.3.3 Resistência fenotípica dos isolados de *S. aureus*

Quanto a caracterização de resistência fenotípica, um total de 57 isolados identificados de *S. aureus* foram testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana (Tabela 10).

Tabela 10. Resistência fenotípica de cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo colonial artesanal Diamante.

Classe antimicrobiana	Agente antimicrobiano e concentração	Resultado do teste de disco difusão Porcentagem (%) de cepas em cada categoria*		
		S	I	R
Beta lactâmico	Penicilina (10 U)	66,67	-	33,33
	Cefoxitina (30 µg)	100	-	-
Tetraciclina	Tetraciclina (30 µg)	77,2	-	22,80
Cefalosporinas	Ceftarolina (5 µg)	98,25	1,75	-
Macrolídeo	Eritromicina (15 µg)	73,69	-	26,31
Lincosamida	Clindamicina (2 µg)	71,93	-	28,07
Aminoglicosídeo	Gentamicina (10 µg)	84,21	-	15,79
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino (5 µg)	-	100	-
Oxazolidinona	Linezolida (10 µg)	96,5	-	3,50
Anfenicol	Clorafenicol (30 µg)	100	-	-
Antimetabólico (antagonista da via do ácido fólico)	Sulfazotrim (25 µg)	96,5	-	3,50

\* S: Sensível na dose padrão; I: Sensível, aumentando a exposição; R: Resistente., de acordo com a padronização do BrCAST, 2022.

As maiores frequências de resistência antimicrobiana foram detectadas para penicilina 33,33% (19/57), clindamicina 28,07% (16/57), eritromicina 26,31% (15/57) e tetraciclina 22,80% (13/57).

Com relação a resistência a meticilina, nenhum dos isolados testados demonstrou resistência a cefoxitina, portanto não foi encontrada nenhuma cepa de MRSA entre os isolados testados. Conforme relatado por Ali e Seiffen (2021), o MRSA é um microrganismo que representa uma ameaça global, especialmente quando presente na comunidade. A detecção do gene *mecA*, integrante do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), é uma das principais evidências de resistência à meticilina em um organismo.

Todos os isolados apresentaram resistência sensível, aumentando a exposição ao Ciprofloxacino. No entanto, vale ressaltar que apesar do Breast preconizar um valor de halo de 50 mm para classificar uma cepa sensível a dose padrão ao ciprofloxacino, trata-se de um valor arbitrário, por conseguinte, podendo ser classificado somente como: sensível, aumentando a exposição ou resistente. A classificação das cepas como sensíveis aumentando a exposição, indica que o sucesso terapêutico pode ser alcançado aumentando o tempo de exposição da dosagem ou a concentração do antimicrobiano durante o tratamento.

A resistência a classe das fluoroquinolonas em *S. aureus*, especialmente os MRSA, está em plena evidência (FAN *et al.*, 2020). Entre os antibióticos da classe das fluoroquinolonas, o ciprofloxacino é usado para o tratamento de infecções por MRSA (EPPS *et al.*, 2020). O ciprofloxacino inibe a ação da DNA girase, impedindo a replicação do DNA bacteriano. Esse antimicrobiano tem ampla atividade antimicrobiana, incluindo *S. aureus*. Contudo, algumas estirpes MRSA são também resistentes a esse antibiótico e outros da classe das fluoroquinolonas (PAPICH, 2016).

Considerando à caracterização de fenótipos de resistência em estudos semelhantes, observamos que Rodrigues *et al.* (2017) identificaram, em amostras de laticínios no Brasil, isolados multirresistentes a cefoxitina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, sendo a resistência à penicilina a mais observada.

A ocorrência de resistência a penicilina (67,11%; 51/76) e tetraciclina (27,63%; 21/76) também foi relatada por Castro *et al.* (2020) em estudos com isolados de queijo Minas artesanal, no Brasil. Outra pesquisa realizada no Sul do Brasil, no estado de Santa Catarina, relatou taxa de resistência a penicilina de 27,8% (15/54), porém, neste caso a tetraciclina foi um dos antibióticos mais sensíveis (7,4%; 4/54) (KUHNEN *et al.*, 2021).

Em consonância com esses estudos, Ferreira *et al.* (2016) avaliaram a presença de 29 isolados de *S. aureus* em queijo Minas Frescal artesanal e industrializado

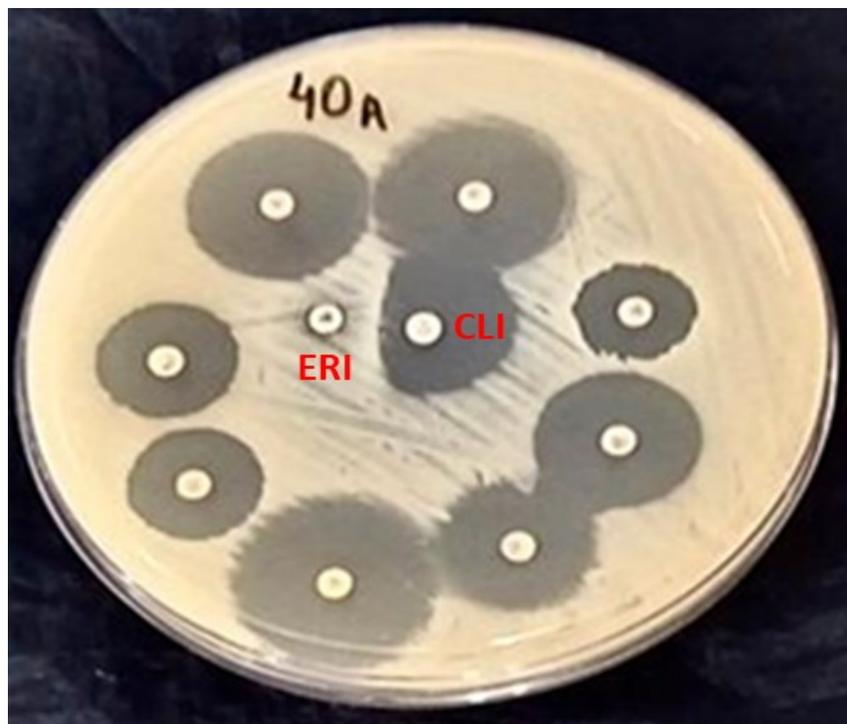
em Goiânia, Brasil, e verificaram que 44,8% (13/29) dos isolados foram resistentes à penicilina e 10,3% (3/29) à tetraciclina, nenhum isolado foi resistente à cefoxitina. Esses resultados corroboram com os nossos, já que também identificamos um maior número de isolados resistentes a penicilina e nenhum resistente a cefoxitina.

Abreu *et al.* (2021) caracterizaram 95 cepas de *Staphylococcus* sp., isoladas da cadeia de produção de queijo Minas Frescal orgânico e convencional em relação à resistência a antibióticos, e constataram que a maioria das cepas (25,3%) demonstrou resistência à penicilina, seguida pela oxacilina (21,1%) e clindamicina (11,6%).

A presença de cepas resistentes na cadeia produtiva de queijo artesanal sugere a necessidade de melhorar os padrões de controle de qualidade, desde a fase da ordenha até o produto final (ABREU *et al.*, 2021). Esses estudos enfatizam a urgência de melhorar os padrões de controle de qualidade em todas as fases da cadeia produtiva de queijos artesanais, devido à alta incidência de resistência a antibióticos, como observado nas taxas de penicilina e tetraciclina. Essas melhorias são essenciais para garantir a segurança microbiológica e qualidade dos produtos lácteos. Adicionalmente, ressalta-se a importância de realizar análises de riscos relacionadas à presença dessas bactérias resistentes nos alimentos, uma vez que podemos encontrar bactérias resistentes em todos os ambientes. Compreender como essas bactérias afetam nossa saúde é fundamental para implementar medidas eficazes na mitigação dos riscos, contribuindo assim para a produção de alimentos mais seguros e saudáveis.

A resistência induzível à clindamicina foi detectada por meio do teste de aproximação de disco eritromicina-clindamicina (teste D), utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer. O princípio desse teste envolve o posicionamento de um disco de eritromicina (15 µg) a uma distância de 12 a 20 mm de um disco de clindamicina (2 µg) em posições adjacentes em uma placa contendo ágar Mueller Hinton (Figura 2).

Figura 2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana com fenótipos de resistência no teste de difusão em disco (Teste D).



Teste D mostrando zona achatada de clindamicina próxima ao disco de eritromicina, demonstrando resistência à clindamicina induzida por eritromicina em isolado de *S. aureus*.

Nesta pesquisa, doze isolados (21,05%) demonstraram resistência induzível a clindamicina. A ocorrência de resistência induzível a clindamicina também foi observada em outros estudos com *S. aureus* isolados de amostras clínicas (RICH *et al.*, 2005; LALL; SAHNI, 2014; RAZEGHI *et al.*, 2019; FAEZI *et al.*, 2021). A eritromicina (um macrolídeo) e a clindamicina (uma lincosamida) pertencem a duas classes distintas de antimicrobianos, mas atuam através do mesmo mecanismo que é a inibição da síntese proteica (STEWART *et al.*, 2005).

A resistência aos macrolídeos pode ocorrer de forma constitutiva ou ser induzida na presença de um indutor de macrolídeos (DELIALIOGLU *et al.*, 2005).

A resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (antibióticos MLSB) em estafilococos pode ocorrer devido à modificação na metilase ribossômica alvo codificada pelos genes *erm* (COUTINHO *et al.*, 2010). Estes genes são responsáveis pela codificação de enzimas chamadas metiltransferases que alteram a estrutura dos ribossomos bacterianos, interferindo na capacidade dos macrolídeos de se ligarem a esses ribossomos, essa modificação do alvo ribossomal é uma estratégia que as

bactérias utilizam para se protegerem da ação dos macrolídeos e de outros antibióticos relacionados (JUNIE; HOMORODEAN, 2008; LALL; SAHNI, 2014). Dessa forma, uma vez induzido, o produto gênico confere resistência cruzada a outros membros do grupo, incluindo lincosamidas e estreptogramina B (LECLERCQ, 2002). A resistência constitutiva ao MLSB pode ser detectada pelo teste de difusão em disco (teste D), onde os discos de eritromicina e clindamicina são colocados próximos um do outro. Nesse contexto, quando se trata de isolados resistentes a eritromicina, a realização do teste D é fundamental para determinar a viabilidade de utilizar a clindamicina como opção terapêutica (LALL; SAHNI, 2014).

Nesse sentido, a clindamicina tem sido usada no tratamento de infecções por *S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA) e por MRSA, especialmente em infecções de pele e tecidos moles (PATEL *et al.*, 2006). No entanto, a ocorrência de resistência induzível à clindamicina levanta uma preocupação, porque pode ocorrer falhas terapêuticas durante o tratamento (MEMARIANI; MEMARIANI; MORAVVEJ, 2021).

Nesse contexto, Lim *et al.* (2002) e Drinkovica *et al.* (2001) destacam que o uso de antibióticos da classe macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B (MLSB) resulta em um aumento significativo na resistência à clindamicina entre as cepas estafilocócicas. De acordo com pesquisas anteriores, cepas com resistência induzível à clindamicina tendem a ser resistentes a vários agentes antibacterianos (SASIREKHA *et al.*, 2014; ADHIKARI *et al.*, 2017).

Quanto ao padrão de multirresistência observado em 21 isolados testados, verificou-se que 42,85% (9/21) deles apresentaram resistência a cinco diferentes classes de antibióticos simultaneamente, enquanto 23,80% (5/21) mostraram resistência a três classes de antibióticos. Adicionalmente, um dos isolados demonstrou resistência a sete classes de antibióticos (Tabela 11).

Tabela 11. Características de multirresistência de isolados de *S. aureus*.

Classe de antibióticos	Antimicrobianos	Isolados resistentes (%)
Beta lactâmicos, macrolídeos, lincosamida	PEN, ERI, CLI	23,80% (5/21)
Beta lactâmicos, tetraciclínas, macrolídeos, lincosamida	PEN, TET, ERI, CLI	4,76% (1/21)
Beta lactâmicos, tetraciclínas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamida	PEN, TET, GEN, ERI, CLI	42,85 % (9/21)
Beta lactâmicos, tetraciclínas, aminoglicosídeos, macrolídeos, linconsamida, oxazolidina, Antimetabólico (antagonista da via do ácido fólico)	PEN, TET, GEN, ERI, CLI, LNZ, SUT	4,76% (1/21)

\* PEN (penicilina); TET (tetraciclina); ERI (eritromicina); CLI (clindamicina); GEN (gentamicina); LNZ (linezolida); SUT (sulfazotrim).

As bactérias multirresistentes são consideradas um desafio global emergente e representam um grave problema de saúde pública. Arslan (2022) destaca que essa resistência é resultado de diversos mecanismos, mas o uso excessivo e inadequado de antibióticos é a principal causa que acelera este problema (ARSLAN, 2022).

A aquisição do mecanismo de resistência adquirido pelo *S. aureus* pode ser classificado em duas categorias: a mutação de um gene bacteriano no cromossomo ou a obtenção de um gene de resistência a partir de outras bactérias por meio de transferência genética horizontal, que pode ocorrer via conjugação, transdução ou transformação (BROWN-JAQUE *et al.*, 2018).

As penicilinas que pertencem à classe dos antibióticos beta-lactâmicos, apresentam atividade bactericida devido à inibição da síntese da parede celular bacteriana (ERMAL; BORGGRAEVE, 2022).

A penicilina G, também conhecida como benzilpenicilina, é o antibiótico mais amplamente utilizado, seguido das tetraciclínas para o tratamento de infecções estafilocócicas em seres humanos e animais em diversos países (IVANOVIC *et al.*, 2023; TRZCINSKI *et al.*, 2000). A resistência à penicilina tem sido consistentemente associada

a grande maioria das cepas de *S. aureus*. Nesse contexto, os resultados deste estudo estão em concordância com os de pesquisas anteriores (BONKO *et al.*, 2021; CEBECI; GÜNDOĞAN, 2021; KALAYU *et al.*, 2020).

Por outro lado, o grupo das tetraciclinas constitui antibióticos estruturalmente relacionados, sendo prescritos para o tratamento de infecções bacterianas, abrangendo tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (FEYSSA *et al.*, 2023). A resistência às tetraciclinas está associada a diversos mecanismos, destacando-se o efluxo de antibióticos, a atividade de proteínas que protegem o ribossomo e a inativação enzimática desses compostos (GAUR; BAL, 2022).

O padrão de resistência às tetraciclinas de *S. aureus* encontrado no presente estudo está de acordo com alguns estudos anteriores que relataram taxas inferiores a 50% dos isolados de *S. aureus* resistentes às tetraciclinas (GEBREMEDHIN *et al.*, 2022; YAKUBU *et al.*, 2020). Conforme apontado por Yakubu *et al.* (2020), a variação nos resultados de resistência pode ser influenciada, em parte, pela frequência de uso do medicamento nas diferentes regiões analisadas.

Neste estudo, foram observadas cepas de *S. aureus* resistentes à gentamicina (15,79%), o que pode ter um impacto em sua aplicação clínica. A gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, com atividade bactericida, capaz de interromper o processo de síntese de proteínas, resultando em morte bacteriana (ADASZYNSKA-SKWIRZYNSKA; SZCZERBINSKA; ZYCH, 2020). No entanto, a intensidade de sua ação depende da concentração: concentrações mais elevadas aumentam a ação bactericida, enquanto concentrações mais baixas levam a uma ação bacteriostática. A aquisição de resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer de duas maneiras: resistência mediada pela enzima modificadora de aminoglicosídeos ou resistência adaptativa (KELMANI CHANDRAKANTH; RAJU; PATIL, 2008).

A presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos nos alimentos pode representar não apenas um perigo biológico, mas também um potencial risco químico que pode gerar riscos para saúde pública, devido à possibilidade de resíduos dessas substâncias nos alimentos. O uso indiscriminado dos antibióticos em animais é um dos principais fatores que contribui para o aumento da detecção de resistência antimicrobiana em cepas isoladas de produtos alimentícios (LEJEUNE; GARCÍA; LATRÔNICO, 2023).

Também é importante destacar a possibilidade dos manipuladores de alimentos serem um potencial reservatório e meio de transmissão de cepas de *S. aureus*

virulentas e resistentes a antimicrobianos, incluindo MRSA, uma vez que esses manipuladores podem ser fontes de contaminação na produção de alimentos (UDO; ALMUFTI; ALBERT, 2009). Principalmente na fabricação de queijos artesanais, as cepas que são transferidas para os alimentos através dos manipuladores podem apresentar resistência aos antibióticos (ANDRÉ *et al.*, 2008).

### 2.3.4 Detecção de genes de exoproteínas de isolados de *S. aureus*

Dos 21 isolados de *S. aureus* previamente selecionados com base no perfil de resistência, submetidos ao método de PCR para detecção dos genes de SEs clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), nenhum deles apresentou tais genes (Tabela 12). Este resultado sugere que não há risco potencial à saúde dos consumidores relacionado às SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE).

Tabela 12. Genes que codificam as enterotoxinas clássicas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico e Leucocina Pantón-Valentine, tipagem por grupos *agr* e *Spa* type em cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo artesanal.

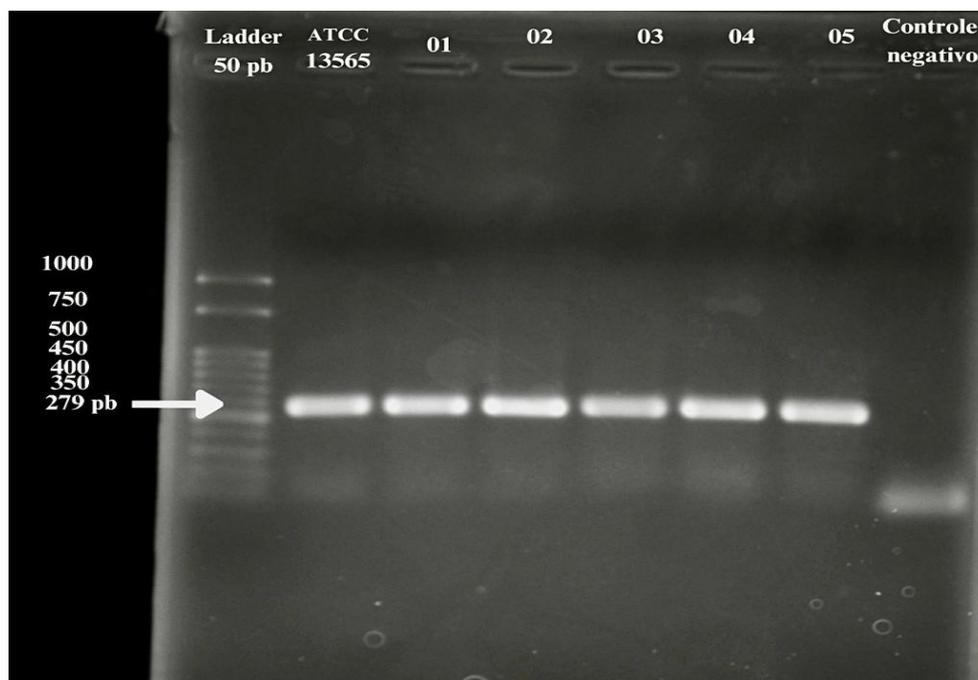
Código do isolado	Genes de virulência*							Grupo <i>agr</i>	<i>Spa</i> type
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>tst</i>	<i>lukS-lukF</i>		
04	-	-	-	-	-	-	-	I	t189
06	-	-	-	-	-	-	+	I	t189
07	-	-	-	-	-	-	+	IV	t518
10	-	-	-	-	-	-	+	I	t2734
14	-	-	-	-	-	-	+	II	t2734
18	-	-	-	-	-	-	+	I	t002
19	-	-	-	-	-	-	-	II	t002
20	-	-	-	-	-	-	-	I	t002
21	-	-	-	-	-	-	-	II	t17308
22	-	-	-	-	-	-	-	I	t1451
24	-	-	-	-	-	-	+	II	t002
25	-	-	-	-	-	-	-	I	t11712
34	-	-	-	-	-	-	+	I	t105
35	-	-	-	-	-	-	-	I	t1451
37	-	-	-	-	-	-	-	I	t1451
38	-	-	-	-	-	-	-	n.d	n.d
39	-	-	-	-	-	-	-	I	t1451
51	-	-	-	-	-	-	-	I	t1451
56	-	-	-	-	-	-	-	II	t105
P2F	-	-	-	-	-	-	-	III	t127
P4I	-	-	-	-	-	-	+	I	t521

\*(n.d.: não detectado; - ausência do gene; + presença do gene).

Em contrapartida, pesquisas realizadas no Brasil demonstraram a presença de genes produtores de enterotoxinas em amostras de queijos. Da Silva Cândido *et al.* (2020), encontraram genes relacionados as SEs clássicas (*seb*) e não clássicas (*seg*, *seh*, *sei* e *sej*) em isolados de queijos Minas Frescal. Júnior *et al.* (2023) verificaram o potencial toxigênico de 177 cepas de *S. aureus* isoladas de queijo Minas Frescal, destas 33,33% foram positivos para o gene *sea* e 48,1% para o gene que codifica a toxina 1 do choque tóxico (TSST-1). Resultados semelhantes foram encontrados por Medeiros *et al.* (2013) que detectaram linhagens de *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e também da toxina TSST-1, durante o processo de fabricação de queijos Minas “in natura” em pequenas queijarias no Estado de São Paulo, Brasil. No estudo de Ferreira *et al.* (2016) entre as SEs, *sec* foi encontrado em 3,4% das amostras de queijo. Ao contrário deste estudo, no qual nenhum gene das enterotoxinas clássicas foi detectado.

Todos os isolados amplificaram o gene *nuc*, responsável pela codificação da enzima termonuclease (Figura 3). Esse gene é responsável pela síntese das termonucleases, que possibilitam às bactérias resistir ao calor e produzir toxinas resistentes a altas temperaturas. Dessa forma, o processamento a uma temperatura entre 115,5 a 118,5 °C não comprometeria a estabilidade da toxina (SUTEJO *et al.*, 2019).

Figura 3. Amplificação por PCR do gene *nuc* nos isolados de *S.aureus*.



Ladder marcador genético de 50 pb. ATCC 13565 controle positivo da reação de PCR, o controle negativo foi realizado com água estéril, sem o DNA dos isolados. O gene *nuc* foi amplificado com um comprimento de banda de 279 pb.

Quanto à amplificação dos genes *tst* e dos genes *lukS-lukF*, nenhum isolado demonstrou a presença do gene *tst*. No entanto, foi possível detectar os genes *lukS-lukF* em 8 (38,9%) dos isolados (Tabela 12). Neste estudo, os oito isolados positivos para o gene *lukS-lukF* codificante da PVL, pertenciam a seis tipos distintos de *spa* (t189, t518, t2734, t002, t105, t521) e aos grupos *agr* I, II e IV.

*S. aureus* é um patógeno relevante, que compreende cepas com diferentes níveis de virulência e capacidade patogênica. Distinguir entre as cepas virulentas e não virulentas é primordial para avaliar as potenciais consequências da presença desse microrganismo na segurança dos alimentos e na saúde pública (WU *et al.*, 2019). A espécie *S. aureus* possui muitos marcadores de virulência, incluindo as SEs, toxinas esfoliativas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), hemolisinas e leucocina Panton-Valentine (PVL) (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Dentre esses marcadores de virulência, a PVL é uma leucotoxina composta por dois componentes (LukS-PV e LukF-PV), adquiridos por transdução (via bacteriófagos), que está presente em algumas cepas de *S. aureus* e desempenha um papel importante na destruição de leucócitos e na necrose tecidual (SHALLCROSS *et al.*, 2013). Foi relatado em um estudo que o risco de mortalidade associado ao *S. aureus* portador da PVL é maior em comparação com o *S. aureus* que não produz PVL (GILLET *et al.*, 2002).

No Brasil, Pineda *et al.* (2023) identificaram cinco isolados de *S. aureus* positivos para o gene *lukF-PV*, que codifica a PVL, em amostras de queijo artesanal Canastra Minas coletadas de cinco produtores diferentes. As cepas pertenciam a quatro tipos de *spa*: t008, t127, t359 e t992. Além disso, a presença de genes de enterotoxinas foi detectada em quatro isolados. A presença de cepas com potencial virulento e toxigênico representa um perigo para a saúde pública e destaca a importância das boas práticas de fabricação e manipulação durante a produção de queijos artesanais para reduzir a presença de cepas patogênicas de *S. aureus*.

No estudo conduzido por Wu *et al.* (2019) no varejo de alimentos na China, 1.581 isolados de *S. aureus* foram analisados, revelando que 4,6% (72) deles testaram positivo para o gene codificante da PVL. As taxas de positividade variaram consideravelmente entre os diferentes tipos de alimentos, com uma taxa de 4,3% em carne crua, 4,7% em alimentos ultracongelados e alimentos prontos para consumo, e uma taxa mais alta de 11,9% em cogumelos comestíveis. Entretanto, é importante destacar que os isolados de leite pasteurizado analisados não continham os genes codificantes para PVL.

Na Argélia, Chenouf *et al.* (2020) identificaram apenas um isolado positivo para os genes que codificam PVL em amostras de leite não pasteurizado. Além disso, outro estudo revelou a presença de nove isolados de *S. aureus*, multirresistentes a antibióticos e portadores dos genes (*lukS-lukF*) em amostras de leite cru na Argélia (CHAALAL *et al.*, 2018). Roshan *et al.* (2022) identificaram os genes codificantes para PVL em 46,7% (20/42) isolados de MRSA de leite bovino.

Na Alemanha, Kraushaar e Fetsch (2014) relataram pela primeira vez a presença de seis isolados de MRSA positivo para genes codificantes da PVL em carne de Javali, sugerindo possível contaminação por manipuladores de alimentos e destacando a necessidade de rigorosas medidas de boas práticas e higiene pessoal durante o manuseio de alimentos. Fall *et al.* (2012) realizaram uma pesquisa envolvendo suínos e agricultores em Dakar, Senegal. Eles identificaram 73 casos de MRSA entre 464 porcos e 52 agricultores. Dentre esses, 43 MRSA positivos para os genes codificantes da PVL, eram provenientes de 10 tipos diferentes de *spa*.

Song *et al.* (2015) identificaram a presença de genes codificadores de PVL em carnes frescas, leite cru, produtos de feijão e alimentos congelados. Além disso, Puaah *et al.* (2016) também relataram a presença *S. aureus* portadores dos genes (*lukS-lukF*) codificantes para PVL em alimentos prontos para o consumo. Pesquisas anteriores indicaram que cepas de *S. aureus* suscetíveis à metilina (MSSA) positivas para os genes portadores da PVL possuíam origens genéticas diversas, sugerindo que o bacteriófago que transporta os genes codificantes da PVL podem ser facilmente disseminados (CHINI *et al.*, 2006). Portanto, esses estudos ressaltam a diversidade de fontes potenciais de contaminação por *S. aureus* positivos para os genes codificantes da PVL em alimentos em todo o mundo.

### 2.3.5 Tipagem *agr*

A patogenicidade de *S. aureus* possui uma base molecular multifacetada, que depende da expressão de uma ampla variedade de produtos gênicos, incluindo proteínas de superfície e proteínas extracelulares (CHEUNG *et al.*, 2011). A expressão desses genes é controlada por um complexo conjunto de sistemas de regulação gênica. Um dos sistemas de regulação de genes de virulência mais conhecidos em *S. aureus* é o locus *agr* (regulador do gene acessório) (CHEUNG *et al.*, 2011; JARRAUD *et al.*, 2002). Este locus corresponde a um sistema de *quorum sensing*, regulando a expressão de genes

codificantes de fatores de virulência de acordo com a densidade populacional (SAKOULAS *et al.*, 2003). Adicionalmente, o locus *agr* pode ser classificado em quatro grupos genéticos distintos, com base em polimorfismos presentes nos genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. Essa classificação permite agrupar os isolados dessa bactéria em quatro categorias principais de *agr* (I, II, III e IV) (DUFOUR *et al.*, 2002; SAKOULAS *et al.*, 2003), sendo que cada tipo específico de *agr* pode estar associado a doenças estafilocócicas específicas ou a linhagens genéticas específicas (JARRAUD *et al.*, 2002).

Nesta pesquisa, as 21 cepas de *S. aureus* que apresentaram perfil de resistência foram submetidas ao método de tipagem por grupos *agr*. Após a análise, observou-se a classificação para *agr* I em 61,90% (13/21), *agr* II em 23,81% (5/21), *agr* III em 4,76% (1/21), e *agr* IV em 4,76% (1/21). Um isolado (4,76%) não foi classificado nos grupos *agr* já conhecidos.

Jarraud *et al.* (2002) relatam que cepas que apresentam os grupos *agr* I e *agr* II causam, preferencialmente, doenças mediadas por enterotoxinas, como a intoxicação alimentar; enquanto o grupo *agr* III está associado à síndrome do choque tóxico. A maioria dos isolados produtores de esfoliatina responsáveis pela síndrome da pele escaldada estafilocócica são membros do grupo *agr* IV.

Curiosamente, os grupos *agr* mais prevalentes nos isolados foram o *agr* I e II. Cabe ressaltar que as amostras de queijo não apresentaram a presença de enterotoxinas, e os isolados não continham os genes responsáveis por produzir essas toxinas, exceto pelos genes portadores da PVL, este foi identificado nos isolados pertencentes aos grupos I, II e IV.

Pesquisas anteriores também relataram que o grupo *agr* I é prevalente entre isolados de mastite subclínica, e que os grupos *agr* I e II demonstra uma maior associação com isolados resistentes a antimicrobianos (MOISE-BRODER *et al.*, 2004; BUZZOLA *et al.*, 2007; BRAHMA *et al.*, 2022). Em conformidade com esses resultados, KHEMIRI *et al.* (2018) relataram a predominância do grupo *agr* I em isolados com resistência a antibióticos, incluindo MRSA. Resultados semelhantes foram observados por Fabres-Klein *et al.* (2015), que identificaram uma distribuição prevalente entre isolados de *S. aureus* de mastite bovina, os grupos *agr* I (22,2%) e II (62,9%). Adicionalmente, Bardiau *et al.* (2016) observaram que as cepas *S. aureus* isoladas de bovinos com mastite, pertencentes ao grupo *agr* I, demonstram alta taxa de invasão. Dessa forma, destaca-se a relevância destes dois grupos na dinâmica de persistência e resistência de *S. aureus*,

corroborando com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antibióticos.

Assim sendo, sugere-se que os grupos *agr* I e II parecem estar mais associados com a resistência antimicrobiana, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, evidenciando a relevância dos grupos *agr* I e II na dinâmica de resistência e sobrevivência do *S. aureus*. Entretanto, é importante destacar que essas associações precisam ser confirmadas por meio de estudos adicionais.

### 2.3.6 Tipagem *spa*

A tipagem *spa* é um método de amplificação por PCR, seguida de sequenciamento do gene *spa* de *S. aureus*.

A tipagem *spa* é baseada na análise das repetições variáveis presentes no gene *spa*. Essas repetições, conhecidas como unidades de repetição de sequência (SRU; do inglês, *short repeat units*), formam uma região hipervariável no gene *spa*. Elas são compostas por sequências curtas de 24 nucleotídeos e variam em número e ordem entre diferentes cepas bacterianas. Essa análise permite a diferenciação e identificação das distintas linhagens de *S. aureus*. O gene *spa* codifica a proteína A, uma proteína de superfície de *S. aureus* que atua como fator de virulência, por estar associada a mecanismos de evasão imunológica. (HARMSSEN *et al.*, 2003; MORENTE *et al.*, 2015).

Neste trabalho, foram identificados 10 tipos *spa* diferentes, sendo o mais frequente o t1451 em 5 isolados (23,81%). Em seguida, o t002 foi identificado em 4 isolados (19,05%), o t189, t2734, t105 cada um em dois isolados (9,52%), e o t518, t17308, t11712, t127, t521 foram identificados cada um em 1 isolado (4,76%). Não foi possível identificar o *spa* em um isolado (4,76%) (Tabela 13).

Tabela 13. Frequência dos *Spa types* encontrados.

<i>Spa type</i>	Frequência	Porcentagem
t1451	5	23,81
t002	4	19,05
t189	2	9,52
t2734	2	9,52
t105	2	9,52
t518	1	4,76
t17308	1	4,76
t11712	1	4,76
t127	1	4,76
t521	1	4,76
Não tipado	1	4,76

\**spa* = gene que codifica a proteína A de *Staphylococcus*.

Em uma pesquisa que analisou 38 isolados de *S. aureus* de vacas com mastite subclínica, também foi identificado um isolado que não apresentou amplificação para o gene *spa* (BHATI *et al.*, 2016).

O tipo de *spa* t1451 destacou-se como o mais prevalente neste estudo. Este tipo específico de *spa* já foi associado a MRSA isolados de manipuladores de alimentos da indústria de suínos, indicando que o contato ocupacional com animais vivos apresenta um elevado risco de colonização por MRSA (ABDULLAHI *et al.*, 2023; QUERO *et al.*, 2023). Adicionalmente Bonnet *et al.*(2018) relatou a presença do tipo *spa* t1451 em isolados associados a infecções graves em hospitais. Outro estudo evidenciou a presença do tipo *spa* t1451 em isolados MSSA provenientes de humanos e animais

Adicionalmente, o tipo t002, o segundo mais encontrado nesta pesquisa, já foi isolado em casos de infecções clínicas (WATTINGER *et al.*, 2012). Em concordância com esses dados, Andrade-Figueiredo e Leal-Balbino (2016) relataram a presença dos tipos t002 e t1451 ao investigar as características clínicas e moleculares de isolados de *S. aureus* causadores de infecções em pacientes internados em hospitais da cidade de Recife, Brasil.

No Brasil, Silva *et al.* (2013) observaram que o tipo t127 foi o mais prevalente (44,6%), em isolados de *S. aureus* suscetíveis à metilicina no leite de vacas com mastite. Enquanto Rodrigues *et al.* (2017), observaram o tipo t127 em apenas 22,72% em isolados

de *S. aureus* de uma fábrica de processamento de queijo. Em contraste, neste estudo apenas um isolado apresentou o tipo t127. Este tipo de *spa* já foi implicado em surtos de intoxicação alimentar (FETSCH *et al.*, 2014).

Já no estudo conduzido por Cândido *et al.* (2020), os tipos de *spa* mais encontrados em queijos foram o t021 (21,05%) e t127 (13,16%), sendo este último já associado a surtos. Em consonância com esse estudo, Li *et al.* (2023) identificaram que o tipo de *spa* mais frequentemente detectado foi o t127 (16%), isolado principalmente em surtos de origem alimentar na China.

Esses estudos evidenciam a dinâmica da diversidade genética do *S. aureus* em diferentes regiões e contextos epidemiológicos.

## 2.4 Conclusão

Os resultados deste estudo revelaram a presença de *S. aureus* nas amostras de queijo artesanal tipo colonial Diamante. Embora as enterotoxinas e seus genes codificantes não tenham sido detectados nas amostras e nos isolados, respectivamente, os genes codificantes da PVL foi encontrado em 38,9% dos isolados, indicando possíveis riscos à saúde dos consumidores. Além disso, foram detectadas cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos e com multirresistência, representando um perigo potencial para a saúde. Foram identificados os tipos *agr* I e II, associados à resistência antimicrobiana. A tipagem *spa* revelou 10 tipos diferentes. O tipo *spa* mais prevalente foi o t1451, já associado a casos de infecções por cepas resistentes a antibióticos. Diante disso, torna-se fundamental realizar mais pesquisas a fim de avaliar os riscos que a presença dessas cepas neste tipo de alimento representa de fato para a saúde humana. Além disso, é essencial implementar um monitoramento rigoroso dos animais envolvidos na produção de alimentos. Adicionalmente, são necessárias melhorias na obtenção do leite, no controle de qualidade e nos padrões de higiene adotados na produção de queijos artesanais. Tais medidas são imprescindíveis para evitar a contaminação e disseminação de cepas de *S. aureus* resistentes, reduzindo, assim, os riscos relacionados aos agentes patogênicos com resistência antimicrobiana transmitidos através da cadeia alimentar, representando ameaças substanciais à saúde humana.

### **CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO PERFIL METATAXONÔMICO DA CADEIA DE PRODUÇÃO DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL DIAMANTE**

**Resumo:** Os gêneros bacterianos encontrados nos queijos artesanais são predominantemente compostos por bactérias do ácido láctico (BAL). No entanto, a segurança microbiológica ainda é uma preocupação para os consumidores. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo utilizar a metataxonomia por meio do sequenciamento de nova geração (NGS) para detectar a presença de *Staphylococcus* sp. e potenciais patógenos em amostras de queijos produzidos com leite cru. Foram analisadas quatro amostras de queijo tipo colonial artesanal coletadas durante a estação do inverno, provenientes de quatro laticínios na região Diamante, localizada em Santa Catarina, Brasil. Os resultados destacaram uma alta prevalência de BAL nas quatro amostras de queijo, com destaque para as espécies de *Lactococcus* sp., porém também foi identificado a presença do DNA de possíveis patógenos. O NGS permitiu compreender a dinâmica da população microbiana em queijos artesanais e pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para a gestão do risco microbiológico na produção de queijos artesanais, assim como em medidas preventivas de controle, visando garantir maior segurança microbiológica.

**Palavras chaves:** Perfil de diversidade microbiana; sequenciamento 16S rRNA; avaliação microbiológica, queijo artesanal brasileiro.

#### **3.1 Introdução**

O queijo artesanal do tipo colonial é elaborado a partir de leite cru e destaca-se como o principal queijo produzido pelas famílias rurais de agricultores na região Sul do Brasil (CARVALHO; LINDNER; FARÍÑA, 2016). Contudo, a questão da segurança microbiológica do leite cru utilizado na produção de queijos continua sendo um tema discutido. Considerado a singularidade desses produtos, torna-se fundamental concentrar esforços em pesquisas para realizar sua caracterização (POSSAS *et al.*, 2021; BONILLA-LUQUE *et al.*, 2023). Diante desse contexto, é importante explorar abordagens de análises que permitam uma caracterização mais precisa da microbiota presente nos queijos.

A análise de diferentes bactérias ou grupos bacterianos tem sido usada como estratégia para avaliar a qualidade microbiológica dos queijos, fornecendo informações sobre a segurança, a presença de patógenos, a fonte potencial de contaminação, assim como as condições higiênicas durante as etapas do processamento (HERVERT *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a identificação molecular e o estudo de bactérias em alimentos processados podem ser desafiadores, ou sofrer limitações quando utilizados métodos convencionais (ABREU *et al.*, 2021). Ferramentas de detecção de patógenos nos alimentos evoluíram rapidamente para testes rápidos, usando aplicação genômica e metagenômica (RIVERA *et al.*, 2018).

A abordagem do sequenciamento de nova geração (NGS; do inglês *New generation sequencing*) na área de microbiologia de alimentos ocorre predominantemente de duas formas: determinação do genoma de um único isolado cultivado, geralmente referido como “sequenciamento do genoma completo”; metagenômica, onde o NGS é aplicado a uma amostra de alimento, gerando sequências múltiplas dos microrganismos na amostra (JAGADEESAN *et al.*, 2019). Apesar de o NGS fornecer informações abrangentes sobre a microbiota total, é importante destacar que esta ferramenta não fornece o número de bactérias vivas em uma amostra de alimento, pois envolve quantificação de DNA (KALLASTU *et al.*, 2023). No entanto, o NGS continua a emergir como uma ferramenta importante para a identificação taxonômica de bactérias (KALLASTU *et al.*, 2023). Sua capacidade única de caracterizar completamente a microbiota presente nos alimentos destaca o potencial desse método na compreensão da composição bacteriana em amostras de alimentos, incluindo a identificação de táxons microbianos, mesmo aqueles não cultiváveis e presentes em pequeno número (MAYO *et al.*, 2014).

O objetivo desta parte da pesquisa de doutorado foi identificar e caracterizar a diversidade microbiana do queijo Diamante usando NGS do gene *rrn16S* bacteriano, chamado metagenoma taxonômico ou *metabarcoding*, com o propósito de melhor compreender a presença de potenciais patógenos e *Staphylococcus* sp.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Obtenção da amostra**

Para a identificação dos microrganismos que compõem a comunidade bacteriana dos queijos artesanais, foram analisadas quatro amostras de queijos, provenientes de quatro produtores de queijo artesanal tipo colonial Diamante (A-D), localizados na região do Diamante, Major Gercino, Santa Catarina. As amostras foram coletadas com 1 dia de fabricação e, em seguida, foram transferidas para o laboratório em temperatura de refrigeração para serem sequenciadas.

A fabricação dos queijos foi feita a partir de leite cru, como já citada no capítulo anterior.

### 3.2.2 Análise molecular usando abordagem metataxonômica

O DNA genômico total dos queijos foi extraído diretamente das amostras, utilizando o método de extração por coluna de sílica. O DNA foi eluído em água livre de DNase e RNase, em concentrações de 1:10 e 1:100 (totalizando três diluições utilizadas para etapas posteriores - original, 1:10 e 1:100). O DNA total extraído das amostras de queijo foi utilizado como modelo para análise metataxonômica rRNA16S, realizada pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil), utilizando a plataforma Illumina NextSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). A preparação da biblioteca de DNA foi realizada utilizando o NGS Protocolo da Neopropecta (CHRISTOFF *et al.*, 2017). A região hipervariável V3-V4 do gene *rrn16S* foi amplificada com os *primers* 31F (5`CCTACGGGRRSGCAGCAG3`) e 806R (5`GGACTACHVGGGTWTCTAAT3`) (CAPORASO *et al.*, 2011; WANG; QIAN, 2009).

Duas PCRs foram realizadas. A primeira, com marcador rRNA 16S, foi realizada em triplicata com as seguintes condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 30 s e 72°C por 45 segundos e extensão final de 72°C por 2 minutos. A segunda, foi realizada para ligação dos adaptadores Illumina. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata usando Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, USA) e em cada rodada, um controle negativo de reação foi incluído (CNR).

As amostras (reações finais de PCR) foram purificadas utilizando microesferas (*beads*) magnéticas, juntadas em *pools* (bibliotecas) e visualizadas em gel de agarose 3% (p/v). As bibliotecas foram quantificadas por sistema fluorimétrico Qubit e por qPCR, a partir de curva padrão utilizando o kit Collibri Library Quantification (Invitrogen, USA). Os *amplicons* provenientes da qPCR também foram visualizados em gel de agarose a 3% (p/v), para verificar os tamanhos dos fragmentos e se não ocorreram

dímeros. As amostras foram então preparadas para o sequenciamento utilizando o kit NextSeq kit P1 600 ciclos, com reações de extremidade emparelhada de  $2 \times 305$  pb.

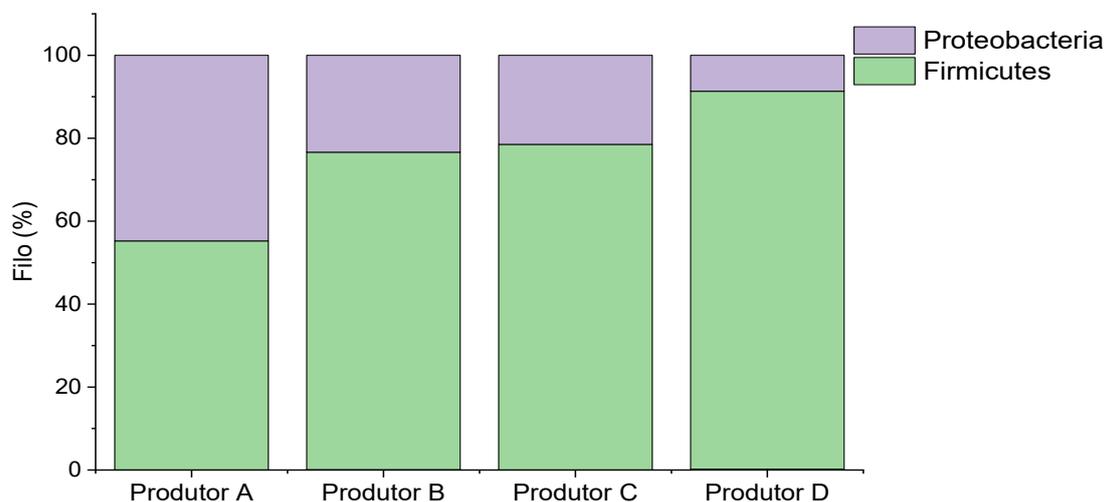
### 3.3 Resultados e discussão

Para estudar a diversidade bacteriana, foram analisadas quatro amostras de queijo, provenientes de diferentes produtores (Denominados de A a D). Essas amostras foram sequenciadas no tempo um (1) de maturação, e a identificação da diversidade bacteriana foi realizada até o nível de espécies.

No total, foram identificados 3 filos, 12 famílias, 6 ordens, 33 gêneros e 68 espécies, dentre as quais foram consideradas nos gráficos da diversidade nas amostras (Proporção em número de leituras sequenciadas) aquelas com  $>1\%$  em abundância em relação ao número total de sequências lidas. Abaixo de  $1\%$ , a confiabilidade é menor na identificação, além de outras razões intrínsecas à análise metagenômica e à questão de autodegradação de DNA. Os resultados estão demonstrados nos gráficos a seguir.

De maneira geral, o perfil taxonômico das amostras de queijos demonstrou que, em termos de filo, os principais encontrados foram Firmicutes e Proteobacteria. Firmicutes foi o táxon dominante no nível filo em todas as amostras das quatro queijarias (A-D) analisadas, apresentando uma abundância relativa de  $55,2\%$ ,  $76,6\%$ ,  $78,5\%$  e  $91,1\%$ , respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Prevalência do filo (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.



Firmicutes compreende bactérias gram-positivas, geralmente presentes no leite (QUIGLEY *et al.*, 2013), e pode ser identificado na microbiota da casca dos queijos, sendo composto principalmente por bactérias como *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., entre outros (IRLINGER *et al.*, 2015).

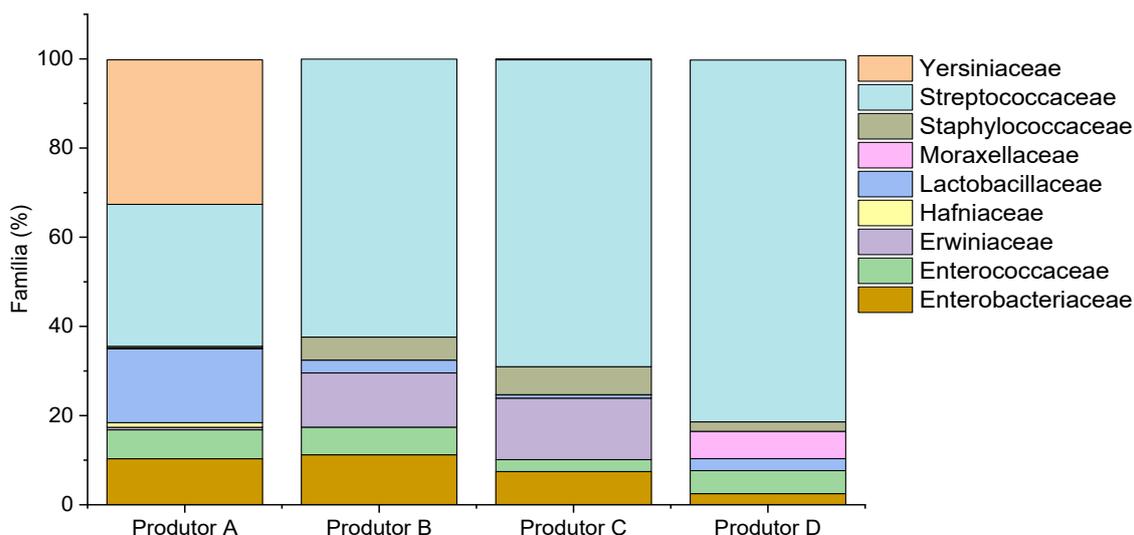
Além disso, essa prevalência pode ser justificada, uma vez que a produção de queijo fundamenta-se na introdução e seleção de bactérias lácticas iniciais e não iniciadoras comuns (NSLAB), como *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, todos pertencentes ao filo Firmicutes, que desempenham um papel significativo na produção de queijo e outros produtos lácteos (DONNELLY, 2013). Um dos gêneros mais proeminentes neste estudo foi *Lactococcus*. Estudos anteriores também identificaram o filo Firmicutes em queijos (DUGAT-BONY *et al.*, 2016; CEUGNIEZ *et al.*, 2017; MURUGESAN *et al.*, 2018; JOSIFOVSKA *et al.*, 2024).

O filo Proteobacteria foi o segundo mais prevalente neste estudo com prevalência de 44,7%, 23,4%, 21,5% e 8,7%, respectivamente. Por outro lado, Proteobacteria inclui as classes Gammaproteobacteria e Bacilli, que compreendem bactérias que podem representar desafios significativos de deterioração e que podem comprometer a segurança dos alimentos nas indústrias de Laticínios (KAMIMURA *et al.*, 2020). Esses resultados corroboram com outros estudos que também indicaram

que Firmicutes e Proteobacteria eram os filos predominantes em queijos artesanais (FALARDEAU *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2021).

Streptococcaceae foi a família de bactérias mais prevalente nas amostras de queijos das quatro queijarias (A-D), apresentando percentuais de 31,8%, 62,3%, 68,8% e 81,1%, respectivamente (Figura 5). Esta família faz parte da ordem Lactobacillales, representada principalmente por bactérias lácticas (BAL) (REUBEN *et al.*, 2023). Além disso, a família Lactobacillaceae, também pertencente à ordem Lactobacillales, foi identificada com maior prevalência (16, 56%) na amostra da queijaria A (Figura 5).

Figura 5 Prevalência das Famílias (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.

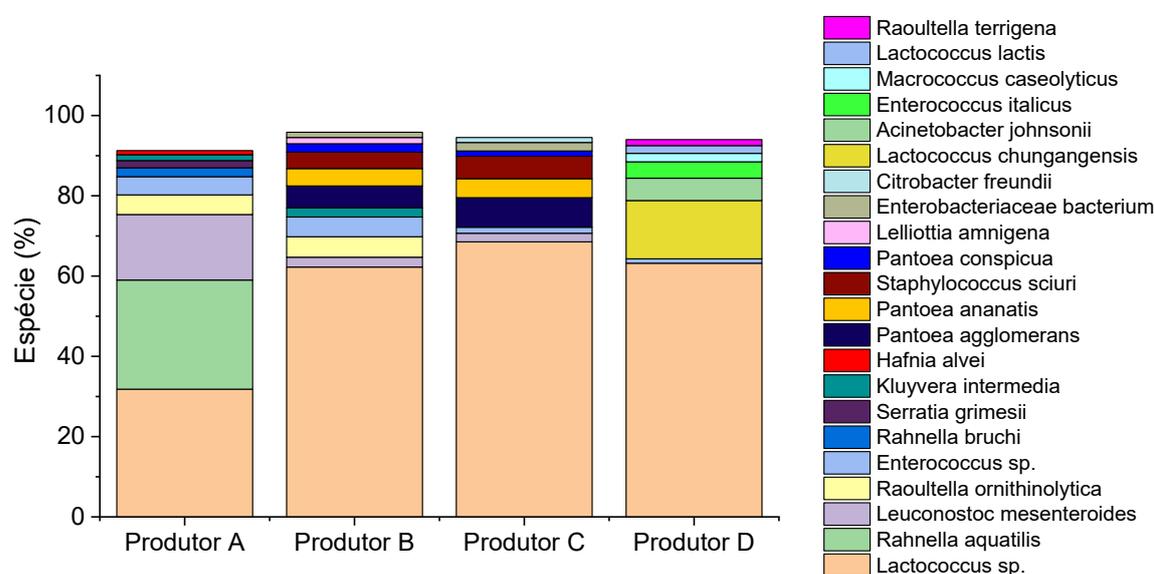


Por outro lado foi detectada a abundância de famílias de bactérias não lácticas, tais como: Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae e Yersiniaceae.

A segunda família mais prevalente nas amostras de queijos foi a Enterobacteriaceae, que pertence a ordem Enterobacterales, apresentando prevalência de 10,3%, 11,2%, 7,44% e 2,4%, respectivamente (Figura 5). Esta família contém patógenos oportunistas que podem ser encontrados no leite cru e seus derivados lácteos (ODENTHAL; AKINEDEN; USLEBER, 2016; KAMIMURA *et al.*, 2020; FIRMO *et al.*, 2023).

No nível das espécies, no geral, foi possível observar uma maior prevalência de *Lactococcus* sp. em todas as amostras dos produtores A, B, C e D, apresentando percentuais de 31,8%, 62,2%, 68,5% e 63,2%, respectivamente (Figura 6). Outras espécies de BAL encontradas na amostra do produtor D, incluíram: *Lactococcus chungangensis* e *Lactococcus lactis*.

Figura 6. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) nas amostras de queijos analisadas.



De acordo com Quigley *et al.* (2011), os gêneros mais prevalentes de BAL no leite incluem: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Lactococcus*, com destaque para o *Lactococcus lactis* sp., frequentemente utilizado como cultura iniciadora na produção de queijos (ZHENG *et al.*, 2021).

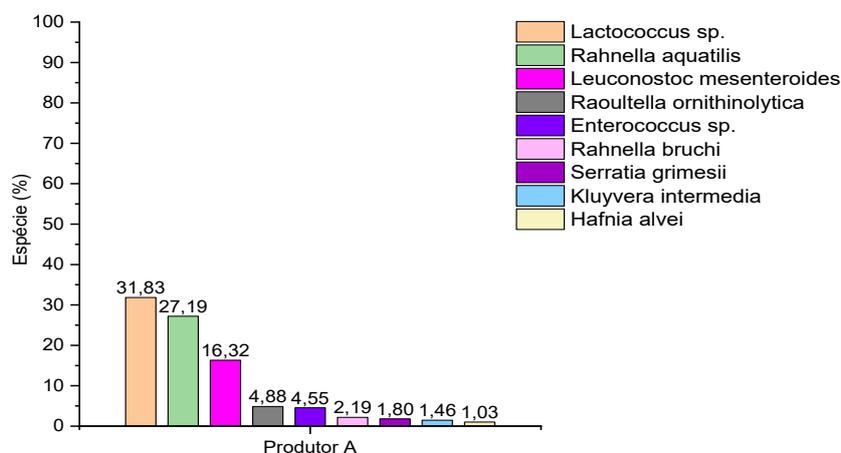
Zdenkova *et al.* (2016) reportam que as BAL são comumente empregadas como agentes de biocontrole em alimentos fermentados, demonstrando a capacidade de inibir a biota patogênica. Portanto, o controle do crescimento de bactérias patogênicas, incluindo *S. aureus*, pelas BAL, tem sido associado à produção de compostos como ácidos orgânicos e bacteriocinas, bem como a alterações no potencial redox e efeitos combinados de estressores ambientais (ZDENKOVA *et al.*, 2016). Esses resultados se alinham com os encontrados neste estudo, uma vez que a presença de *S. aureus* nas amostras analisadas por sequenciamento do gene *rrnA16S* foi inferior a 1% das espécies

identificadas. Esses achados sugerem que as cepas de BAL presentes podem ter exercido certo biocontrole sobre o *S. aureus* nas amostras dos queijos.

Cepas de *Lactococcus* sp., geralmente apresentam a capacidade de gerar ácido de forma rápida, contribuindo assim para a obtenção de sabores e texturas distintos (LEROY; VUYST, 2004). Nesse contexto, *Lactococcus* sp., desempenha um papel na conversão de aminoácidos em compostos que contribuem para o sabor, como álcoois, cetonas e aldeídos. Adicionalmente, eles também estão envolvidos no metabolismo de lipídeos, o que contribui para a complexidade sensorial dos produtos (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

As Figuras 6 e 7 apresentam as prevalências das espécies acima de 1% (mais prevalentes), considerando as amostras dos produtores A e B, respectivamente.

Figura 7. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor A.



Os dados obtidos na amostra do produtor A, revelam a prevalência das espécies de *Lactococcus* sp. (31,8%), *Rahnella aquatilis* (27,1%), *Leuconostoc mesenteroides* (16,3%) e *Enterococcus* spp. (4,5%).

As espécies de *Leuconostoc* sp. são BAL, que desempenham papel na formação do aroma e da textura de determinados produtos lácteos (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004). Particularmente essas espécies, podem produzir CO<sub>2</sub>, responsável pela formação de “olhos” em muitos queijos artesanais, elaborados a partir de leite cru (CARDAMONE *et al.*, 2011).

Particularmente, *L. mesenteroides*, identificado em três amostras de queijos (A, B, C) é amplamente utilizado na produção de alimentos fermentados, atuando como excelentes iniciadores, produção de alimentos funcionais, suplementos nutricionais e bacteriocinas (SU *et al.*, 2023). Além disso, destacam-se como produtores de exopolissacarídeos (EPS), substâncias intimamente relacionadas à saúde humana, evidenciando notáveis atividades anti-inflamatórias, antibacterianas e imunomoduladoras (YANG *et al.*, 2020; LUAN *et al.*, 2022).

No estudo conduzido por SU *et al.* (2023), 178 cepas de *L. mesenteroides* isoladas de diversas fontes, revelaram-se produtoras de bacteriocinas de classe ii C, com destaque para a enterocina e a enterococina. Notavelmente, 85% dos isolados demonstraram a capacidade de produzir ambas essas bacteriocinas. Essas características, aliadas aos benefícios probióticos e atividades funcionais previamente mencionados, consolidam o potencial desta cepa na promoção da saúde humana.

Neste estudo, a presença de *enterococos* sp. foi identificada em todas as amostras de queijos analisadas. Essa espécie é caracterizada como BAL e sua presença geralmente está associada a utilização de leite não pasteurizado na produção de queijos artesanais (SONEI; EDALATIAN DOVOM; YAVARMANESH, 2024).

Existem mais de 21 espécies de enterococos, sendo as mais predominantes o *Enterococcus faecium*, o *Enterococcus faecalis* e, em menor proporção, o *Enterococcus durans*. Essas bactérias, frequentemente presentes no trato digestivo de humanos e animais devido à sua resistência a sais e ácidos biliares, são isoladas de diversos alimentos, como leite, queijo e carne (BHARDWAJ *et al.*, 2010). Além disso, as enterocinas, que são bacteriocinas produzidas por cepas de enterococos, apresentam uma grande diversidade, sendo que cada cepa pode gerar diferentes tipos de enterocinas com base em seu conteúdo genético e ambiente de crescimento (SONEI; EDALATIAN DOVOM; YAVARMANESH, 2024).

Essas bacteriocinas podem desempenhar um papel importante no controle do crescimento de patógenos alimentares, motivando pesquisas sobre o potencial dos *Enterococos* sp. como agentes protetores (FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006).

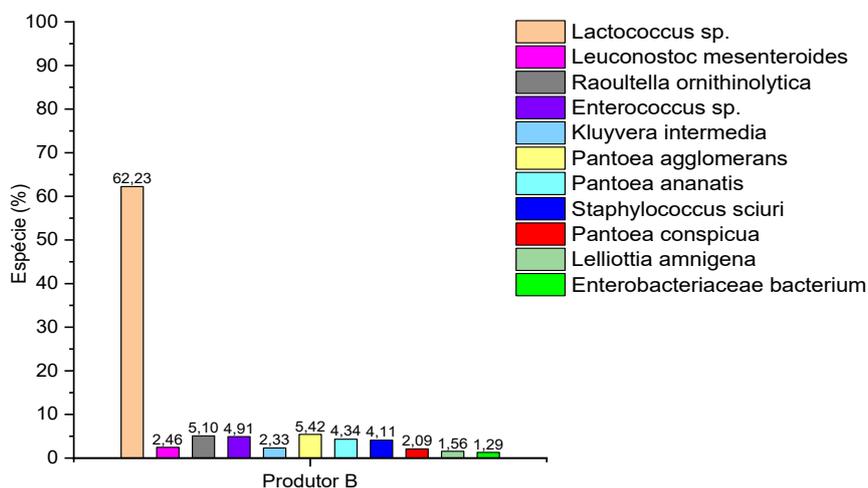
Contudo, certas cepas de enterococos são patogênicas, podendo desencadear doenças, especialmente em ambientes nosocomiais, causando graves infecções, bacteremia, endocardite e infecções do trato urinário (KAYSER, 2003). Além disso, essas cepas podem abrigar genes de resistência a antibióticos e de virulência (SONEI; EDALATIAN DOVOM; YAVARMANESH, 2024). Portanto, no que diz respeito a

questões de segurança, as espécies de *Enterococcus* ainda não possuem o status GRAS (geralmente reconhecidas como seguras pelo FDA), nem foram recomendadas para a lista QPS (do inglês *Qualified presumption of safety* da EFSA) (BACCOURI *et al.*, 2019; RICCI *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Özkan, Demirci e Akin (2021), foi demonstrado que a maior atividade inibitória de cepas de *Enterococcus faecium* ocorreu contra *S. aureus*, isolados de amostras de queijo. Em contrapartida, outros estudos conduzidos por Sonei *et al.* (2024) e Zommiti *et al.* (2018) avaliaram a capacidade inibitória dos enterococos contra bactérias potencialmente patogênicas, e nenhum dos isolados de enterococos testados apresentou efeito antagônico ao *S. aureus* ATCC 25923.

Dentre os microrganismos indesejáveis, na análise da amostra do queijo do produtor A, notou-se a presença destacada de *Rahnella aquatilis* (27,19%), uma bactéria Gram-negativa, pertencente à ordem *Enterobacterales*. Essa cepa foi inicialmente isolada de água doce em 1976, e sua presença tem sido associada a casos raros de infecções humanas (GAITÁN; BRONZE, 2010). No estudo realizado por O'Hara *et al.* (1998) foi relatado que a maioria dos isolados de *R. aquatilis* apresenta resistência predominante às aminopenicilinas, carboxipenicilinas e cefalosporinas de primeira geração, essa resistência decorre da produção natural de beta-lactamase pela maioria dos isolados. Além disso, foi destacado que eles exibem resistência inata à maioria dos macrolídeos, oxacilina, glicopeptídeos e rifampicina, assemelhando-se a outras *Enterobacterales*, e mais recentemente, foi detectada a resistência à fosfomicina.

Figura 8. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor B.

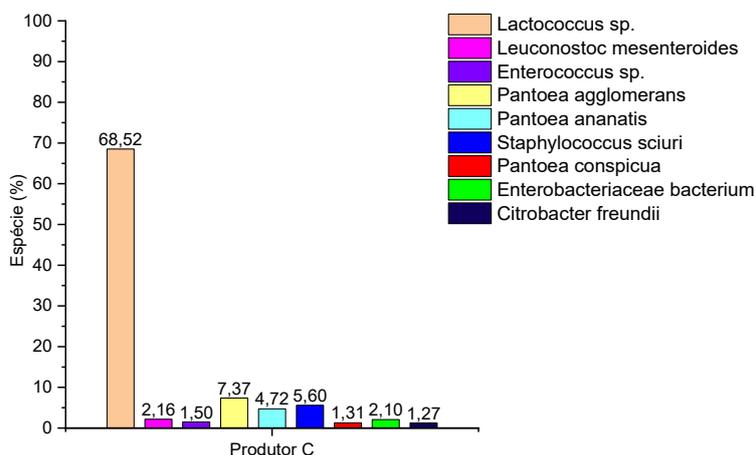


Outras espécies indesejáveis da ordem *Enterobacterales*, tais como: *Raoultella ornithinolytica*, *Lelliottia amnigena*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea conspicua*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei* foram detectadas com menor prevalência nas amostras de queijos analisadas. Dentre essas, *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* e *Hafnia alvei* são considerados patógenos oportunistas (JENKINS *et al.*, 2017; BÜYÜKCAM *et al.*, 2018).

Esta família desempenha papel importante em relação aos aspectos de deterioração e segurança. Além disso, algumas espécies, como os coliformes são indicadores de qualidade e higiene (METZ; SHEEHAN; FENG, 2020). Certas cepas de bactérias pertencentes a esta ordem taxonômica são patogênicas, como por exemplo algumas estirpes de *Salmonella* e *Escherichia coli* (MUMY, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2019). Além disso, muitas cepas podem manifestar resistência a antibióticos (TEPELI; DEMIREL ZORBA, 2018). A resistência a antibióticos, comumente codificada por plasmídeos, é uma característica comum em enterobactérias, aumentando o risco de disseminação de seus genes de resistência (ANJUM *et al.*, 2019). Esses microrganismos afetam diversos produtos lácteos, como leites em pó, queijos e iogurtes, sendo implicados em alguns surtos (SINGH; ANAND, 2022).

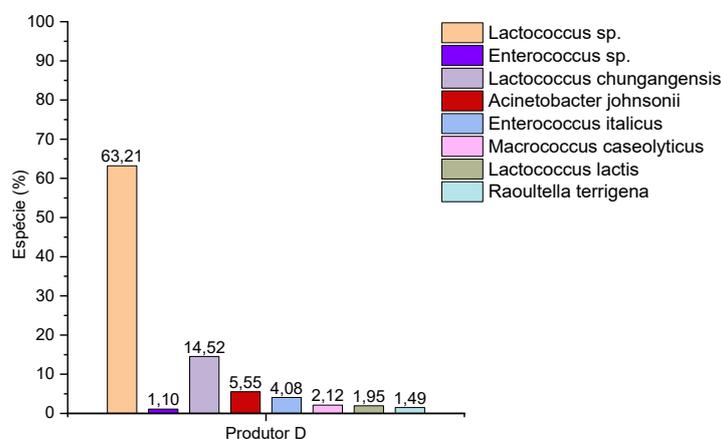
A seguir as Figuras 9 e 10 apresentam as prevalências das espécies acima de 1% (mais prevalentes), considerando as amostras dos produtores C e D.

Figura 9. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor C.



Foi observada a presença de *Staphylococcus sciuri* nas amostras de queijos provenientes dos produtores B e C. Nemeghaire *et al.* (2014) destacam que as espécies de *S. sciuri* tem potencial patogênico. Embora as infecções causadas por essas espécies sejam pouco frequentes, os autores ressaltaram a capacidade dessa espécie de carregar múltiplos genes de virulência e resistência. Portanto, sua presença pode indicar um risco à saúde, porém mais estudos são necessários para avaliar este risco.

Figura 10. Prevalência das espécies (>1% em abundância em relação ao número total de seqüências obtidas) identificadas no queijo artesanal na análise metataxonômica do produtor D.



*L. chungangensis* foi identificado na amostra de queijo do produtor D, representando 14,5% (Figura 7). Estudos anteriores destacaram que essa cepa pode ser utilizada na fabricação de produtos lácteos, evidenciando atividades funcionais, como álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), além de outras atividades enzimáticas, como amilase, proteinase e lipase (KONKIT *et al.*, 2014; KONKIT; CHOI; KIM, 2016).

A atividade do ADH contribuída pelos *lactococos* no queijo, especialmente em níveis mais elevados em *L. chungangensis*, tem o potencial de intensificar o metabolismo do álcool no intestino, reduzindo assim a exposição dos órgãos internos a essa substância (KONKIT; CHOI; KIM, 2015). Além disso, o queijo pode ser fonte de ALDH, que pode diminuir os níveis de aldeídos no corpo humano, indicando que apresenta potencial para se tornar uma nova opção como alimento funcional (KONKIT; CHOI; KIM, 2016). Esses resultados apontam para uma perspectiva favorável quanto ao papel de *L. chungangensis* para melhorar as propriedades funcionais dos queijos.

Em síntese, a análise metataxonômica destacou a prevalência de uma microbiota caracterizada pela presença de BAL, entre as quais *Lactococcus* sp. representou a espécie mais predominante. Essa abordagem configura-se como uma ferramenta importante para a identificação de diversas espécies bacterianas, incluindo aquelas participantes nos processos de fermentação, deterioração e eventuais patógenos.

Portanto, pode ser usada para compreender a ecologia microbiana e contribuir para a qualidade e segurança dos queijos artesanais.

### 3.4 Conclusão

A abordagem metataxonômica evidenciou a presença de diversas espécies bacterianas nas amostras dos queijos, com destaque para as BAL, especialmente *Lactococcus* sp. O estudo ressaltou a reduzida presença de *Staphylococcus* sp. (<1% em abundância em relação ao número total de sequências obtidas nas amostras), indicando uma possível atuação das BAL como culturas de biocontrole, capazes de inibir microrganismos potencialmente patogênicos nos queijos artesanais. No entanto, dada a identificação de DNA de espécies potencialmente patogênicas e que oferece riscos à saúde dos consumidores, incentiva-se o contínuo trabalho de melhoria da qualidade na cadeia de produção e um controle rigoroso para melhorar a segurança dos alimentos. Em síntese, o estudo metataxonômico proporcionou uma avaliação das espécies bacterianas (presentes ou passadas pela matriz) não cultiváveis pelos métodos tradicionais de contagem e isolamento microbiano. Por fim para uma compreensão mais abrangente da diversidade microbiana nos queijos artesanais e das interações entre os microrganismos autóctones e a inibição de espécies patogênicas, sugere-se a realização de pesquisas mais aprofundadas a fim de esclarecer essas dinâmicas.

### 5.0 CONCLUSÃO GERAL

A análise das amostras de queijo artesanal tipo colonial Diamante revelou a presença de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, indicando um potencial risco à saúde pública. Apesar de não terem sido detectadas enterotoxinas clássicas e seus genes produtores, a identificação dos genes (*lukF-lukS*) codificantes da PVL nos isolados sugere possíveis riscos à saúde dos consumidores. Destacou-se a presença de isolados pertencentes aos quatro grupos de *agr*, sendo o *agr* I e II os mais prevalentes, já associados à resistência antimicrobiana. Quanto aos *spa-types*, observou-se uma diversidade de 10 tipos diferentes, sendo o t1451 o mais comum entre os isolados de *S. aureus*.

A abordagem metataxonômica evidenciou uma presença diversificada de espécies bacterianas nas amostras dos queijos, com destaque para as BAL, especialmente *Lactococcus* sp. Apesar da identificação reduzida de *Staphylococcus* sp., a presença de espécies com potencial risco à saúde demanda a implementação de medidas de controle mais rigorosas.

Com o intuito de obter uma compreensão mais abrangente da diversidade microbiana nos queijos artesanais e das interações entre os microrganismos autóctones e a inibição de espécies patogênicas, sugere-se a continuação das pesquisas. Essas investigações podem proporcionar *insights* valiosos para o aprimoramento das práticas de produção e controle, contribuindo assim para a segurança e qualidade dos queijos artesanais.

Em síntese, os resultados desta tese de doutorado destacam a importância de aprimorar o controle das boas práticas na produção dos queijos para mitigar riscos à saúde pública, decorrentes da disseminação de cepas resistentes de *S. aureus*. Assim, sugere-se realizar mais pesquisas para análise de riscos e a adoção rigorosa de boas práticas visando garantir a segurança microbiológica desses produtos tão apreciados.

## REFERÊNCIAS

- ABDEEN, E.E. *et al.* A. Antibiogram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from milk products and public health implications. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 1968-1974, 2020.
- ABDEL-HAMEID AHMED, A. *et al.* Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. **Food Control**, v. 104, p. 20-27, 2019.
- ABDULLAHI, I. N. *et al.* Nasal staphylococci community of healthy pigs and pig-farmers in Aragon (Spain). Predominance and within-host resistome diversity in MRSA-CC398 and MSSA-CC9 lineages. **One Health**, v. 16, p. 100505, 2023.
- ABEBE, R. *et al.* Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 1–11, 2016.
- ABIQ. 2021. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <<https://www.abiq.com.br/index.asp>>. Acesso em 10 de Agosto de 2021.
- ABNT NBR ISO 6888-1:2016. Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies).
- ABDULLAHI, I. N. *et al.* Nasal staphylococci community of healthy pigs and pig-farmers in Aragon (Spain). Predominance and within-host resistome diversity in MRSA-CC398 and MSSA-CC9 lineages. **One Health**, v. 16, p. 100505, 2023.
- ABOLGHAIT, S.K. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in nonrefrigerated raw chicken livers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 328, p. 108669, 2020.
- ABRÃO, M.G. *et al.* Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 49, p. 978–982, 2005.
- ABREU, A. C. S. DA *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 4012–4022, 2021.
- ACAI, P. *et al.* *Staphylococcus aureus* in unripened ewes' lump cheese. Part 1: Exposure assessment after first 24 h of fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 53, p. 143-151, 2014.
- ADHIKARI, R. P. *et al.* Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 4–8, 2017.

- ADASZYNSKA-SKWIRZYNSKA, M.; SZCZERBINSKA, D.; ZYCH, S. Antibacterial activity of lavender essential oil and linalool combined with gentamicin on selected bacterial strains. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 2, p. 115–118, 2020.
- ALI, G. H.; SEIFFEIN, N. L. Association of some virulence genes in Methicillin resistant and Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* infections isolated in community with special emphasis on pvl/mecA genes profiles in Alexandria, Egypt. **Gene Reports**, v. 25, p. 101334, 2021.
- ALJASIR, S.F.; D'AMICO, D.J. The effect of protective cultures on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production. **Food Microbiology**, v. 91, p. 103451, 2020.
- ALMEIDA, T.T.DE. *et al.* The complex microbiota of artisanal cheeses interferes in the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria and staphylococci. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104791, 2020.
- AL-NABULSI, C. A. *et al.* Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: A new potential tool to fight bacterial biofilms. **Food Control**, v. 107, p. 106815, 2020.
- AL-NABULSI, A.A. *et al.* Factors affecting the viability of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin during processing and storage of white-brined cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 18158, 2020.
- ALVES, V.F. *et al.* Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 247-253, 2018.
- ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: High prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B. *et al.* Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 200–207, 2008.
- ANDRETTA, M. *et al.* Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 10790-10798, 2019.
- ANGELIDIS, A.S. *et al.* Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from milk of dairy goats under lowinput farm management in Greece. **Veterinary Microbiology**, v. 247, p. 108749, 2020.
- ANJUM, M. *et al.* Fate of CMY-2-encoding plasmids introduced into the human fecal microbiota by exogenous *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, 2019.
- ARAGÃO, B.B. *et al.* Short communication: High frequency of  $\beta$ -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.102, p. 6923-6927, 2019.

ARAGÃO, B. B. *et al.* Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 84, 2022.

ARCURI, E. F. *et al.* Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **Journal of food protection**, v. 73, n. 12, p. 2225-2231, 2010.

ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **TOXINS**, v.2, p. 1751-1773, 2010.

ARIAS-ROTH, E. *et al.* Cheese / Raw Milk Cheeses. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 299-308, 2022.

Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00248-8>

ARSLAN, I. Trends in Antimicrobial Resistance in Healthcare-Associated Infections: A Global Concern. **Encyclopedia of Infection and Immunity**, Elsevier, Pages 652-661, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00111-7>.

BACCOURI, O. *et al.* Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated from Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–15, 2019.

BARCUDI, D. *et al.* MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study. **Journal of Infection**, v. 80, n. 1, p. 24–37, 2020.

BARDIAU, M. *et al.* Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. **Veterinary Microbiology**, v. 185, p. 1–6, 2016.

BASANISI, M.G. *et al.* Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food Microbiology**, v. 62, p. 141-146, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.020>

BENCARDINO, D.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, J. Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: An ongoing challenge in public health. **Food Control**, v. 130, p. 108362, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108362>

BHATI, T. *et al.* Polymorphism in spa gene of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. **Veterinary World**, v. 9, n. 4, p. 421–424, 2016.

BHARDWAJ, A. *et al.* Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 3, p. 156–164, 2010.

BISWAS, S.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 3, p. 207–220, 2008.

BONNET, I. *et al.* High prevalence of spa type t571 among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients in a French University Hospital. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–11, 2018.

BONNET, S. *et al.* Methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in pork industry workers, Catalonia, Spain. **One Health**, v. 16, p. 1–7, 2023.

BONKO, M. D. A. *et al.* Antibiotic susceptibility of *staphylococcus aureus* and *streptococcus pneumoniae* isolates from the nasopharynx of febrile children under 5 years in Nanoro, Burkina Faso. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.

BONILLA-LUQUE, O. M. *et al.* Tracking microbial quality, safety and environmental contamination sources in artisanal goat cheesemaking factories. **Food Microbiology**, v. 114, 2023.

BOOLCHANDANI, M.; D’SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356–370, 2019.

BORGES, M. D. F. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1431-1438, 2008.

BRAHMA, U. *et al.* Antibiotic Resistance and Molecular Profiling of the Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis from India. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, 2022.

BRANDIELLI, M. C. *et al.* Physicochemical parameters and lactic acid bacteria count during ripening of Brazilian regional cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 877-884, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022. A diretoria colegiada da agência nacional de vigilância sanitária aprova a instrução normativa nº 161, de 01 de julho de 2022. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 julho. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 724 de 01 de julho de 2022. A diretoria colegiada da agência nacional de vigilância sanitária aprova a RDC nº 724 01 de julho de 2022. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 de julho, 2022.

BRASIL. Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. 19 de agosto de 2020. Brasília, DF.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 64 de 11 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da União**. Ed. 240, seção 1, p.59, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos. Boletim epidemiológico 32, v.51, 2020. Disponível em: < <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/17/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf>> Acesso em: 25 de janeiro de 2021.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos]. Versão 11.0 do Eucast, 2021. Disponível em: < <http://brcast.org.br/documentos/>> acesso em: 15 de janeiro de 2022.

BROWN-JAQUE, M. *et al.* Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 434–442, 2018.

BÜYÜKCAM, A. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 304–309, 2018.

BUZZOLA, F. R. *et al.* Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 886–891, 2007.

CAI, H. *et al.* Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. **Food Control**, v. 123, p. 107759, 2021.

CAMARGO, A. C. *et al.* Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. **Food Research International**, v. 139, 2021.

CÂNDIDO, T.J. S.DA. *et al.* Enterotoxigenic potential and molecular typing of *Staphylococcus* sp. isolated from organic and conventional fresh minas cheese in the state of Sao Paulo, Brazil. **International Dairy Journal**, v.102, 2020.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARDAMONE, L. *et al.* Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 4, p. 457–470, 2011.

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

CARVALHO, M. D. M. *et al.* a Produção De Queijo Colonial Artesanal No Município De Seara, Estado De Santa Catarina, Frente À Legislação Brasileira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 5, p. 253, 2016.

- CASTRO, A.; SILVA, J. TEIXEIRA, P. *Staphylococcus aureus*, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. **Foodborne Diseases**, cap.8, p. 213-238, 2018.
- CASTRO, R.D. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.103, 2020.
- CEBECİ, T.; GÜNDOĞAN, N. Enterotoxin Production and Antibiotic Resistance Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Samples. **Hitit Medical Journal**, v. 3, n. 2, p. 13–19, 2021.
- CEUGNIEZ, A. *et al.* Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 65–69, 2017.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; GAJEWSKA, J. S. epidermidis strains from artisanal cheese made from unpasteurized milk in Poland - Genetic characterization of antimicrobial resistance and virulence determinants. **International Journal of Food Microbiology**, v.294, p. 55-59, 2019.
- CHATTERJEE, S.S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical Epidemiology**, v.5, p. 205-217, 2013.
- CHENOUF, N. S. *et al.* Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and PVL/*mecA* genes in cefoxitin-susceptible *Staphylococcus aureus* (t044/ST80) from unpasteurized milk sold in stores in Djelfa, Algeria. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 2684–2692, 2021.
- CHEUNG, G. Y. C. *et al.* Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1927–1935, 2011.
- CHIEFFI, D. *et al.* Novel insights into the enterotoxigenic potential and genomic background of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. **Food Microbiology**, v, 90, 103482, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103482>
- CHINI, V. *et al.* Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 1, p. 29–34, 2006.
- CHUNG, H. Y. *et al.* Molecular interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and chicken breast reveals enhancement of pathogenesis and toxicity for food-borne outbreak. **Food Microbiology**, v. 93, p. 103602, 2021.
- CLAEYS, W.L. *et al.* Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, p. 251-262, 2013.
- COUTINHO, V. DE L. S. *et al.* Distribution of erm genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 564–568, 2010.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LOIR, Y.LE. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 127-150, 2011.

CRETENET, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. **Environmental Microbiology Reports**, v.3, p. 340–351, 2011.

CHRISTOFF, A. P. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprospecta.S3.Amazonaws.Com**, n. May 2017, 2017.

CUNHA NETO, A. DA.; SILVA, C. G. M. DA.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Food Science and Technology**, v. 22, p. 263-271, 2002.

DA SILVA ABREU, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4012–4022, 2021.

DA SILVA CÂNDIDO, T. J. *et al.* Enterotoxigenic potential and molecular typing of *Staphylococcus* sp. isolated from organic and conventional fresh minas cheese in the state of São Paulo, Brazil. **International Dairy Journal**, v. 102, 2020.

D'AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. **Cheese - Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese**. Cap. 22, p. 573-594, 2017.

DE CASTRO, CISLAGHI, FABIANE PICININ; BADARÓ, ANDRÉA CÁTIA LEAL. Dilemas da produção de queijo colonial artesanal do sudoeste do paran . **Revista Faz Ciência**, v. 23, n. 37, p. 108-124, 2021.

DE DEA LINDNER, J. *et al.* Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science & Technology**, v. 88, p. 511-523, 2008.

DELIALIOGLU, N. *et al.* Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. **Jpn J Infect Dis**, v. 58, n. 2, p. 104-6, 2005.

DENDANI CHADI, Z. *et al.* Usefulness of molecular typing methods for epidemiological and evolutionary studies of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 8, p. 103338, 2022.

DEGENHARDT, R. *et al.* Brazilian artisanal Colonial cheese: characterization, microbiological safety, and survival of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* during ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.54, p. 2129-2135, 2023. doi: [10.1007/s42770-023-01022-1](https://doi.org/10.1007/s42770-023-01022-1).

DELACROIX-BUCHET, A. Milk maturation temperature and time are key technological parameters to limit staphylococcal enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacture. **Food Control**, v. 59, p. 118-127, 2016.

- DE OLIVEIRA, C. A. F. *et al.* Food safety: good manufacturing practices (GMP), sanitation standard operating procedures (SSOP), hazard analysis and critical control point (HACCP). In: **Antimicrobial food packaging**. Academic Press, 2016. p. 129-139.
- DIAZ, R.; RAMALHEIRA, E.; AFREIXO, V.; GAGO, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new mecC gene—a meta-analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, p. 135-140, 2016.
- DONNELLY, C. W. From Pasteur to Probiotics: A Historical Overview of Cheese and Microbes. **Microbiology Spectrum**, v. 1, n. 1, 2013.
- DOULGERAKI, A.I. *et al.* Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. **Research in Microbiology**, v. 168, p. 1-15, 2017.
- DRINKOVIC, D. *et al.* Tratamento com clindamicina de *Staphylococcus aureus* que expressa resistência indutível à clindamicina. **Revista de Quimioterapia Antimicrobiana**, v. 48, n. 2, pág. 315-316, 2001.
- DUFOUR, P. *et al.* High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1180–1186, 2002.
- DUGAT-BONY, E. *et al.* Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 265–273, 2016.
- DUQUENNE, M. *et al.* Milk maturation temperature and time are key technological parameters to limit staphylococcal enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacture. **Food Control**, v. 59, p. 118-127, 2016.
- EL-FAR, A. SAMIR, S. *et al.* Assessment of eugenol inhibitory effect on biofilm formation and biofilm gene expression in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, v.89, p. 104722, 2021.
- EPPS, Q. J. *et al.* State of the art in cystic fibrosis pharmacology—Optimization of antimicrobials in the treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations: I. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) antibiotics. **Pediatric Pulmonology**, v. 55, n. 1, p. 33–57, 2020.
- ERMAL I.; BORGGRAEVE W. DE. 2.02 – Penicillins. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV**, Elsevier, p. 116-158, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818655-8.00141-4>.
- FABRES-KLEIN, M. H. *et al.* An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2015.
- FAEZI, N. A. *et al.* Plausible challenges of methicillin and clindamycin resistance detection in *Staphylococcus aureus*. **Gene Reports**, v. 24, n. March, p. 101179, 2021.
- FALL, C. *et al.* Epidemiology of *staphylococcus aureus* in pigs and farmers in the largest farm in Dakar, Senegal. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 10, p. 962–965, 2012.

FAN, K. C. *et al.* **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v.10, p. 1-5, 2020.

FARIAS, F.M.; NASCIMENTO, J.S.; SANTOS, O.C.S.; BASTOS, M.C.F. Study of the effectiveness of staphylococins in biopreservation of Minas fresh (Frescal) cheese with a reduced sodium content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 304, p. 19-31, 2019.

FALARDEAU, J. *et al.* Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. **Food Microbiology**, v. 83, p. 48–58, 2019.

FERREIRA, J. S. *et al.* Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil. **Food Control**, v. 37, p. 395-400, 2014.

FERREIRA, M.A. *et al.* Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 8589-8597, 2016.

FETSCH, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, n. April 2013, p. 1–6, 2014.

FEYISSA, N. *et al.* Isolation, identification, and determination of antibiogram characteristics of *Staphylococcus aureus* in cow milk and milk products (yoghurt and cheese) in West Showa Zone, Ethiopia. **International Dairy Journal**, v. 137, p. 105503, 2023.

FINNEGAN, L. A. *et al.* **Next Generation Sequencing Methods: Pushing the Boundaries**. [s.l.] Elsevier, 2020.

FIRMO, M. J. N. *et al.* Diagnosis of the microbiological quality of fiscal artisanal Minas cheese samples. **Food Control**, v. 153, n. January, 2023.

FLEUROT, I. *et al.* Following Pathogen Development and Gene Expression in a Food Ecosystem: the Case of a *Staphylococcus aureus* Isolate in Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, p. 5106 –5115, 2014.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American journal of epidemiology**, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

FOX, E.M.; JIANG, Y.; TINOCO, M.B. *Staphylococcus aureus* – Dairy. Reference Module in Food Science, v. 4, p. 11-116, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22986-7>

FUSCO, V.; QUERO, G.M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 528-537, 2011.

- GAITÁN, J. I.; BRONZE, M. S. Infection caused By *Rahnella aquatilis*. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 339, n. 6, p. 577–579, 2010.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, L. *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 595-603, 2011.
- GAUR, S.; BAL, A.B. 7.07 – Tetracyclines. **Comprehensive Pharmacology**, Elsevier, p. 136-153, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00185-7>.
- GEBREMEDHIN, E. Z. *et al.* Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Milk and Milk Products , Associated Factors for Contamination , and Their Antibigram in Holeta , **Central Ethiopia**. v. 2022, 2022.
- GILLET, Y. *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, v. 359, n. 9308, p. 753–759, 2002.
- GRACE, D.; FETSCH, A. *Staphylococcus aureus*— a foodborne pathogen: epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: an overview. **Book staphylococcus aureus**, chapter 1, p. 3-10, 2018.
- GRECELLE, C.B.Z. *et al.* Characterization of *Staphylococcus* species isolated in production stages of Brazilian colonial cheese. **Journal of Tropical Pathology**, v. 49, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v49i1.60380>
- GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583–592, 2014.
- GUIMARÃES, M. A. *et al.* A comparison of virulence patterns and in vivo fitness between hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the USA400 clone. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 497–509, 2015.
- GUIMARÃES, F.F. DE. *et al.* Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2866-2872, 2013.
- HARMSSEN, D. *et al.* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5442–5448, 2003.
- HAW, S. R. *et al.* Intramammary infections in lactating Jersey cows : Prevalence of microbial organisms and association with milk somatic cell count and persistence of infection. **Journal of Dairy Science**, 2023.
- HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467–494, 2004.
- HENNEKINNE, J-A. *et al.* How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. **Toxins**, v. 2, p. 2106-2116, 2010.

HENNEKINNE, J-A.; staphylococcus aureus as a leading cause of foodborne outbreaks worldwide. **Book *staphylococcus aureus***, cap, 7, p. 129-146, 2018.

HERRERA, F.C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; SANTOS, J.A. Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 7872-7876, 2016.

HERVERT, C. J. *et al.* Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7033–7042, 2016.

HOEKSTRA, J. *et al.* Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. **Scientific reports**, v. 10, p.1-11, 2020.

HUMMERJOHANN, J. *et al.* Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1305–1312, 2014.

HU, D-L.; NAKANE, A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 722, p. 95-107, 2014.

HU, Dong-Liang *et al.* *Staphylococcus aureus* enterotoxins. In: ***Staphylococcus aureus***. Academic Press, p. 39-55, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00003-6>

HWANG, D.; KIM, S. MIN; KIM.; HYUN J. Modelling of tetracycline resistance gene transfer by commensal *Escherichia coli* food isolates that survived in gastric fluid conditions. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 1, p. 81-87, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.009>.

IRLINGER, F. *et al.* Cheese rind microbial communities: Diversity, composition and origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 2, 2015.

ISMALAJ ERMAL;, W. D. B. 2.02 - Penicilinas. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV**, v. 2, p. 116–158, 2022.

IVANOVIC, I. *et al.* Penicillin resistance in bovine *Staphylococcus aureus*: Genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 1, p. 462–475, 2023.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.

JAGADEESAN, B. *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food Microbiology**, v. 79, n. November 2018, p. 96–115, 2019.

JARRAUD, S. *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.

JENKINS, C. *et al.* Enterobacteriaceae. **Infectious Diseases**, 2-Volume Set, p. 1565-1578.e2, 2017.

JOHLER, S. *et al.* Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. **Toxins**, v. 7, p. 997-1004, 2015a.

JOHLER, S. *et al.* Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2915-2920, 2018.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUGUENIN, MC.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Milk Science**, v.98, p. 2944-2948, 2015b.

JOSIFOVSKA, S. *et al.* Amplicon-based metagenomic characterization of the microbiome of the traditional “Bieno” cheese produced in North Macedonia. **Food Bioscience**, v. 57, n. September 2023, p. 103552, 2023.

JUNIE, L. M.; HOMORODEAN, D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and MLSB (Macrolide-Lincosamide-Stretogramin B) Isolated from Community and Hospital-Associated Infections (Ca/Ha-MRSA). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. e272-e273, 2008.

JÚNIOR, R. J. C. *et al.* Toxigenic characterization, spoilage potential, and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* species isolated from Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, 2023.

KADLEC, K.; WENDLANDT, S.; FEBLER, A.T.; SCHWARZ, S. Methods for the Detection of Antimicrobial Resistance and the Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Food-Producing Animals and Food of Animal Origin. **Antimicrobial Resistance and Food Safety**, Cap.12, p. 207-232, 2015.

KALAYU, A. A. *et al.* Burden and antimicrobial resistance of *S. aureus* in dairy farms in Mekelle, Northern Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2020.

KALLASTU, A. *et al.* Absolute quantification of viable bacteria abundances in food by next-generation sequencing: Quantitative NGS of viable microbes. **Current Research in Food Science**, v. 6, n. January, p. 100443, 2023.

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

KAMIMURA, B. A. *et al.* Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, n. February, p. 103453, 2020.

KAMIMURA, B.A.; FILIPPIS, F.DE.; SANT’ANA, A.S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40-49, 2019.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 255–262, 2003.

KELMANI CHANDRAKANTH, R.; RAJU, S.; PATIL, S. A. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 558–562, 2008.

KHEMIRI, M. *et al.* Genetic characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and nasal samples of healthy cows in Tunisia: First report of ST97-t267-agrI-SCCmecV MRSA of bovine origin in Tunisia. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 161–165, 2018.

KIES, S.; VUONG, C.; HILLE, M.; PESCHEL, A.; MEYER, C.; GÖTZ, F.; OTTO, M. Control of antimicrobial peptide synthesis by the *agr* quorum sensing system in *Staphylococcus epidermidis*: activity of the antibiotic epidermin is regulated at the level of precursor peptide processing. **Peptides**, v. 24, p. 329–338, 2003.

KLIBI, A.; MAAROUF, A.; TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, p. 930-935, 2018.

KLUYTMANS, J. A. J. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency?. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 1, p. 11-15, 2010.

KONKIT, M. *et al.* Transcriptomic analysis of *Lactococcus chungangensis* sp. nov. and its potential in cheese making. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7363–7372, 2014.

KONKIT, M.; CHOI, W. J.; KIM, W. Alcohol dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: Application in cream cheese to moderate alcohol uptake. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 5974–5982, 2015.

KONKIT, M.; CHOI, W. J.; KIM, W. Aldehyde dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: Application in cream cheese to reduce aldehyde in alcohol metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1755–1761, 2016.

KRAUSHAAR, B.; FETSCH, A. First description of PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wild boar meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 68–73, 2014.

KUHNEN, S. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of milk pathogen isolated from dairy production systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 194, n. August, p. 105451, 2021.

KÜREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2675-2679, 2016.

LALL, M.; SAHNI, A. K. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 70, n. 1, p. 43–47, 2014.

LANGLEY, R.J.; FRASER, J.D.; PROFT, T. Bacterial superantigens and superantigen-like toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein*. **Toxins**, cap.32, p. 911-974, 2015.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 4, p. 482-492, 2002.

LEJEUNE T.J.; GARCIA, A.D.; LATRONICO, F. Chapter 20 - Antimicrobial resistance and antimicrobial residues in the food chain. **Present Knowledge in Food Safety**, Academic Press, P. 297-302, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00045-7>.

LEKE, A.; GOUDJIL, S.; MULLIE, C.; GROGNET, S.; BIENDO, M. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains from raw human breast milk. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 14, p. 26-35, 2017.

LEROY, S.; LEBERT, I.; ANDANT, C.; TALON, R. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 326, p. 108653, 2020.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIAO, X.; MA, Y.; DALIRI, M.B-M.; KOSEKI, S.; WEI, S.; LIU, D.; YE, X.; CHEN, S.; DING, T. Interplay of antibiotic resistance and food-associated stress tolerance in foodborne pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 97-106, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.006>.

LI, W. *et al.* Association between antibiotic resistance and increasing ambient temperature in China: An ecological study with nationwide panel data. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**, v. 30, p. 100628, 2023.

LIM, J. A. *et al.* Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 489-495, 2002.

LINA, G. *et al.* SUPERANTIGENS, I.C.N.F.S. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LOIR, Y.L.; HENNEKINNE, J.A. Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v, 3 p. 494-500, 2014.

LPSN. Gênero *Staphylococcus*. *Jornal internacional de microbiologia sistemática e evolutiva*. Disponível em: < <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus> > acesso em: 15 de março de 2021.

LUAN, C. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* LVBH107 Antibacterial Activity against *Porphyromonas gingivalis* and Anti-Inflammatory Activity against *P. gingivalis* Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. **Nutrients**, v. 14, n. 13, 2022.

- MACHADO, I.; SILVA, L.R.; GIAOURIS, E.D.; MELO, L.F.; SIMÕES, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its Inhibition – Review. **Food Research International**, v.127, p. 108754, 2020.
- MAHANTI, A.; JOARDAR, S.N.; Bandyopadhyay, S.; Banerjee, J.; Ghosh, S.; Batabyal, K.; Sar, T.K.; Dutta, T.K.; Samanta, I. Characterization of methicillin-resistant and enterotoxins producing *Staphylococcus aureus* in bovine milk in India. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100017, 2020.
- MAMA, O.M.; GÓMEZ-SANZ, E.; RUIZ-RIPAL, L.; GÓMEZ, P.; TORRES, C. Diversity of staphylococcal species in food producing animals in Spain, with detection of PVL-positive MRSA ST8 (USA300). **Veterinary Microbiology**, v. 233, p. 5-10, 2019.
- MARCH-ROSSELLÓ, G. A. Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica** (English ed.), v. 35, n. 3, p. 182–188, 2017.
- MAYO, B. *et al.* Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. **Current Genomics**, v. 15, n. 4, p. 293–309, 2014.
- MCLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O’NEILL, G. The Detection of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEDEIROS, M. I. M. *et al.* Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 98–105, 2013.
- MEDVEĐOVÁ, A.; VALÍK, E. *Staphylococcus aureus*: characterization and quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. **Structure and function of food engineering**, p. 71-102, 2012. doi: 10.5772/48175.
- MEHLI, L.; HOEL, S.; THOMASSEN, G.M.B.; JAKOBSEN, A.N.; KARLSEN, H. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **International Dairy Journal**, v. 65, p. 20-27, 2017.
- MEMARIANI, M.; MEMARIANI, H.; MORAVVEJ, H. Inducible clindamycin resistance among clinical *Staphylococcus aureus* strains in Iran: A contemporaneous systematic review and meta-analysis. **Gene Reports**, v. 23, n. December 2020, p. 101104, 2021.
- METZ, M.; SHEEHAN, J.; FENG, P. C. H. Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses – A literature review. **Food Microbiology**, v. 85, n. November 2018, 2020.
- MOISE-BRODER, P. A. *et al.* Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 12, p. 1700–1705, 2004.
- MORENTE, E. O.; DEL POSTIGO RUIZ, A. G.; PULIDO, R. P. *Staphylococcus*: Detection. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 128–132, 2015.

- MOURA, G.S. *et al.* Short communication: Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 7804-7807, 2018.
- MUMY, K. L. *Salmonella*. **Encyclopedia of Toxicology**: Third Edition, v. 3, p. 211–212, 2014.
- MURUGESAN, S. *et al.* Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. **Food Research International**, v. 113, n. April, p. 371–381, 2018.
- NASROLAHEI, M. *et al.* Bacterial assessment of food handlers in Sari City, Mazandaran Province, north of Iran. **Journal of infection and public health**, v. 10, p. 171-176, 2017.
- NECIDOVA, L.; BOGDANOVICOVA, K.; HARUSTIAKOVA, D.; BARTOVA, K. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 8638-8643, 2016.
- NEMEGHAIRE, S. *et al.* The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 342–356, 2014.
- NOURI, A.; AHARI, H.; SHAHBAZZADEH, D. Designing a direct ELISA kit for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk samples. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1732-1737, 2018.
- NUNES, M.M.; CALDAS, E.D. Preliminary Quantitative Microbial Risk Assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 524-531, 2017.
- O'CALLAGHAN, T.F.; SUGRUE, I.; HILL, C.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Nutritional aspects of raw milk: a beneficial or hazardous food choice. In: **Raw milk**. Academic Press, 2019. p. 127-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00007-9>.
- OBAIDAT, M.M.; ROESS, A.A.; MAHASNEH, A.A.; AL-HAKIMI, R.A. Antibiotic-resistance, enterotoxin gene profiles and farm-level prevalence of *Staphylococcus aureus* in cow, sheep and goat bulk tank milk in Jordan. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 28-34, 2018.
- ODENTHAL, S.; AKINEDEN, Ö.; USLEBER, E. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German dairy farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 72–78, 2016.
- O'HARA, K. *et al.* Appearance of fosfomycin resistant *Rahnella aquatilis* clinically isolated in Japan. **Microbios**, v. 95, n. 381, p. 109-115, 1998.
- OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, p. 877-886, 2015.
- OMOE, K. *et al.* Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3627–3631, 2013.

- ONICIUC, E-A. *et al.* Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. **Trends in Food Science & Technology**, v.61, p. 49-59, 2017.
- ÖZKAN, E. R.; DEMIRCI, T.; AKIN, N. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of Enterococcus faecium strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. **Lwt**, v. 141, n. January, 2021.
- PAPADOPOULOS, P. *et al.* *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. **Food Microbiology**, v. 84, 2019.
- PAPICH, M. G. Ciprofloxacin Hydrochloride. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, p. 159–161, 2016.
- PARISI, A. *et al.* Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. **Food Microbiology**, v. 58, p. 36-42, 2016.
- PATEL, M. *et al.* Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2481–2484, 2006.
- PATERSON, G.K.; HARISSON, E.M.; HOLMES, M.A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, v. 22, p. 42-47, 2014.
- PATERSON, G.K.; MORGAN, F.J.E.; HARRISON, E.M *et al.* Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p. 598-602, 2014.
- PENNONE, V. *et al.* Application of genomics and metagenomics to improve food safety based on an enhanced characterization of antimicrobial resistance. **Current Opinion in Food Science**, v.43, p.183-188, 2022.
- PEPE, O.; BLAIOTTA, G.; BUCCI, F.; ANASTASIO, M.; APONTE, M.; VILLANI, F. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, p. 7057–7062, 2006.
- PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.22, p. 792-802, 2020.
- PIMENTA-MARTINS, M.G.R.; BORGES, M.F.DE.; FURTADO, R.F.; ALVES, C.R. Métodos de análises rápidas para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. Documentos 165. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** (EMBRAPA), 2013.
- PINEDA, A.P.A. *et al.* Overview on Diversity and Microbiological Safety of Brazilian Artisanal Cheeses. 2020. **Preprints** 2020, 2020090123 (doi: 10.20944/preprints202009.0123.v1).

PINEDA, A. P. A. *et al.* Genomic characterization of *Staphylococcus aureus* from Canastra Minas Artisanal Cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 2103–2116, 2023.

PODKOWIK, M.; PARK, J.Y.; SEO, K.S.; BYSTRONÍ, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 34-40, 2013.

POSSAS, A.; BONILLA-LUQUE, O. M.; VALERO, A. From cheese-making to consumption: Exploring the microbial safety of cheeses through predictive microbiology models. **Foods**, v. 10, n. 2, 2021.

PREZZI, L.E.; LEE, S.H.I.; NUNES, V.M.R.; CORASSIN, C.H. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a probiotic Minas Frescal cheese. **Food Microbiology**, v. 92, p. 3-8, 2020.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H.; MARY ANNE TAN, J. A. Virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods: Detection of *S. aureus* contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, 2016.

QUIGLEY, L. *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

QUIGLEY, L. *et al.* Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2–3, p. 81–94, 2011.

RAJKOVIC, A. *Staphylococcus*: Food Poisoning. **Encyclopedia of Food and Health**, p.133-139, 2016.

RAMOS, G. L. P. A.; VIGODER, H. C.; NASCIMENTO, J. S. Technological Applications of *Macrocooccus caseolyticus* and its Impact on Food Safety. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 11–16, 2021.

RANDAZZO, C.L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p. 1-9, 2009.

RAZEGHI, M.; SAFFARIAN, P.; GOUDARZI, M. Incidence of inducible clindamycin resistance and antibacterial resistance genes variability in clinical *Staphylococcus aureus* strains: A two-year multicenter study in Tehran, Iran. **Gene Reports**, v. 16, n. April, 2019.

REGULAMENTO DA COMISSÃO (CE NO 1441/2007), 2007. Regulamento (CE) n. 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.

REGULAMENTO DA COMISSÃO (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, que estabelece regras de higiene específicas relativas à higiene dos géneros alimentícios. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:en:PDF> (inglês). Acesso em: 10 de outubro de 2023.

REIS, S.V. DOS. *et al.* Remarkable capacity of brosimine b to disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) preformed biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 1, 2020.

REUBEN, R. C. *et al.* Universal drivers of cheese microbiomes. **iScience**, v. 26, n. 1, 2023.

RIBEIRO, A. *et al.* Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, n. 3, p. 339–345, 2007.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10850–10854, 2019.

RICCI, A. *et al.* Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, 2017.

RIMOLDI, S.G. *et al.* Remitting infections due to community-acquired Pantón–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in the Milan área. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, p. 255-259, 2018.

RIVERA, D. *et al.* Approaches to empower the implementation of new tools to detect and prevent foodborne pathogens in food processing. **Food Microbiology**, v. 75, p. 126–132, 2018.

RODRIGUES, M.X. *et al.* Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 5167-5175, 2017.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products. **Food Control**, v.60, p. 302-308, 2016.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. *et al.* Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v, p.560-566, 2010.

ROLA, J.G.; KORPYSA-DZIRBA, W.; CZUBKOWSKA, A.; OSEK, J. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 4273-4278, 2015.

ROSENGREN, A.; LINDBLAD, M.; LINDQVIST, R. The effect of undissociated lactic acid on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p. 159-166, 2013.

- ROSHAN, M. *et al.* Virulence and enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 80, p. 101724, 2022.
- RUDENKO, N.V.; KARATOVSKAYA, A.P.; NOSKOV, A.N. *et al.* Immunochemical assay with monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxin H. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, p. 741-750, 2018.
- RUL, F.; MONNET, V. How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality. **Current Opinion in Food Science**, v.2, p. 100-105, 2015.
- SAEKI, E.K.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 2020.
- SAKOULAS, G. *et al.* *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) group II: Is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 6, p. 929–938, 2003.
- SALGADO-PABÓN, W.; TRAN, P. M. Staphylococcal food poisoning. In: **Foodborne Infections and Intoxications**. Academic Press, p. 417-430, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00025-6>.
- SANTA CATARINA. Lei N° 18.250, de 10 de Novembro de 2021, dispõe sobre os requisitos exigidos para elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru e adota outras providências. Assembleia Legislativa do Estado de Santa Catarina, 2021. Disponível em: <<https://leisestaduais.com.br/sc/lei-ordinaria-n-18250-2021-santa-catarina-dispoe-sobre-os-requisitos-exigidos-para-elaboracao-do-regulamento-tecnico-de-identidade-e-qualidade-do-queijo-colonial-artesanal-de-leite-cru-e-adota-outras-providencias>> Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.
- SASIREKHA, B. *et al.* Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated *Staphylococcus aureus*. **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 85–89, 2014.
- SCHELIN, J., WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M.T. *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, p. 580-592, 2011.
- SCHOENFELDER, S. M. K. *et al.* Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 79–87, 2017.
- SHAHID, A. H. *et al.* Molecular detection of vancomycin and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food processing environments. **One Health**, v. 13, p. 100276, 2021.
- SHALLCROSS, L. J. *et al.* The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 43–54, 2013.

SHOPSIN, B. *et al.* Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 456–459, 2003.

SILVA, G.O.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, L.G. *et al.* Viability of *Staphylococcus aureus* and expression of its toxins (SEC and TSST-1) in cheeses using *Lactobacillus rhamnosus* D1 or *Weissella paramesenteroides* GIR16L4 or both as starter cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 4100-4108, 2020.

SILVA, N. C. C. *et al.* Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 6856–6862, 2013.

SINGH, N.; ANAND, S. Enterobacteriaceae. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (Third Edition), Academic Press, p. 482-489, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22978-8>.

SLOW FOOD BRASIL. Queijo Colonial Diamante. Arca do gosto. 2020 Disponível em: [https://slowfoodbrasil.org/arca\\_do\\_gosto/queijo-colonial-diamante/](https://slowfoodbrasil.org/arca_do_gosto/queijo-colonial-diamante/) Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 591–610, 2005.

SONEI, A.; EDALATIAN DOVOM, M. R.; YAVARMANESH, M. Evaluation of probiotic, safety, and technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from lighvan and koozeh cheeses. **International Dairy Journal**, v. 148, p. 105807, 2024.

SONG, M. *et al.* Genetic diversity and virulence potential of *staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p. 1–8, 2015.

STEINBACH, J. *et al.* Understanding consumer, consumption, and regional products: A case study on traditional colonial-type cheese from Brazil. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 26, p. 100418, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100418>

STEWART, C. D. *et al.* Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1716–1721, 2005.

STEWART, G.C. Staphylococcal Food Poisoning. *Foodborne Diseases*, 3 ed. Cap. 18, p.367-380, 2017.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v.41, p. 4089-4094, 2003.

SUTEJO, S. V. H.; AMARANTINI, C.; BUDIARSO, T. Y. Molecular detection of *Staphylococcus aureus* resistant to temperature in milk and its products. **AIP Conference Proceedings**, v. 1908, n. May 2017, 2017.

- SU, X. *et al.* Genome and functional diversity of *Leuconostoc mesenteroides* from different habitats and geographic locations. **Food Bioscience**, v. 55, p. 102834, 2023.
- SUZUKI, Y.; ONO, H.K.; SHIMOJIMA, Y.; KUBOTA, H. *et al.* A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. **Food Microbiology**, v.92, p.103588, 2020.
- TABLA, R. *et al.* Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. **Small Ruminant Research**, v. 145, p. 123–129, 2016.
- TAVARES, A. B. *et al.* Queijo artesanal produzido no sul do Rio Grande do Sul: avaliação físico-química, microbiológica e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus coagulase positiva*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.
- TEPELI, S. Ö.; DEMIREL ZORBA, N. N. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)– and AmpC  $\beta$ -lactamase–producing Enterobacteriaceae in a cheese production process. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2906–2914, 2018.
- THAPA, S. P.; SHRESTHA, S.; ANAL, A. K. Addressing the antibiotic resistance and improving the food safety in food supply chain (farm-to-fork) in Southeast Asia. **Food Control**, v. 108, n. August 2019, p. 106809, 2020.
- TILOCCA, B. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, p. 103534, 2020.
- TITOUCHE, Y. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. **Journal of Dairy Science**, v.102, p. 6876-6884, 2019.
- TORRES, R. T. *et al.* Mapping the scientific knowledge of antimicrobial resistance in food-producing animals. **One Health**, v. 13, p. 100324, 2021.
- TRZCINSKI, K. *et al.* Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 763–770, 2000.
- TURCHI, B.; BERTELLONI, F.; MARZOLI, F. *et al.* Coagulase negative staphylococci from ovine milk: Genotypic and phenotypic characterization of susceptibility to antibiotics, disinfectants and biofilm production. **Small Ruminant Research**, v. 183, 2020.
- UCHIYAMA, T.; IMANISHI, K.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KATO, H. Staphylococcal superantigens and the diseases they cause. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**, cap.50, p. 830-843, 2006.
- UDO, E. E.; AL-MUFTI, S.; ALBERT, M. J. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants. **BMC Research Notes**, v. 2, p. 2–7, 2009.

UMEBA, K.; NAKAMURA, H. YAMAMOTO, K.; NISHINA, N. *et al.* Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, p. 30-35, 2017.

UPADHYAY, N.; NARA, S. Lateral flow assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in milk. **Microchemical Journal**, v. 137, p.435-442, 2018.

VALERO, A. *et al.* Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 186–194, 2009.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; ZDENKOVA, K.; DEMNEROVA, K. Expression and production of staphylococcal enterotoxin C is substantially reduced in milk. **Food Microbiology**, v.44, p. 54-59, 2014.

VALÍK, L.; ACAI, P.; MEDVEDOVÁ, A. Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk. **Food Control**, v. 87, p. 145-152, 2018.

VAUGHN, J.M.; ABDI, R.D.; GILLESPIE, B.E.; DEGO, O.K. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v.144, p. 104171, 2020.

VERAS, J. F., DO CARMO *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive *staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VERCELLI, C.; GAMBINO, G.; AMADORI, M. Implications of Veterinary Medicine in the comprehension and stewardship of antimicrobial resistance phenomenon. From the origin till nowadays. **Veterinary and Animal Science**, p. 100249, 2022.

VERDIER-METZ, I. *et al.* Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305–310, 2009.

VIÇOSA, G.N. *et al.* Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 308, p. 108291, 2019.

VIÇOSA, G.N. *et al.* Egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 227-230, 2013.

VÝROSTKOVÁ, J. *et al.* Antimicrobial resistance of *staphylococcus* sp. Isolated from cheeses. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022.

WANG, H. Y.; KIM, S.; KIM, J.; PARK, S. D.; UH, Y.; LEE, H. Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. **Journal of clinical microbiology**, v.52, p. 1911-1920, 2014.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

WENDLANDT, S. *et al.* The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, p. 338-349, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>, acesso em: 8 de abril de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017. Disponível em: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1), acesso em: 17 de junho de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, acesso em: 08 de janeiro de 2019.

WU, H.; MOSER, C.; WANG, H-Z.; HØIBY, N.; SONG, Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v.7, p. 1-7, 2014.

WU, S. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of PVL-positive *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 304, n. May, p. 119–126, 2019.

XIE, Q. *et al.* identification of a Molecular Latch that Regulates Staphylococcal Virulence. **Cell Chemical Biology**, v. 26, p. 548–558, 2019.

XU, Z. *et al.* Antibiotic resistance and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* recovered from hospital personnel in China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.22, p. 195-201, 2020.

YANG, J. J. *et al.* Production of electricity and reduction of high-fat diet-induced IL-6 by glucose fermentation of *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 4, p. 651–656, 2020.

YAKUBU, A. *et al.* Prevalence and antibiotic susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products in Nasarawa State, Nigeria. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2020.

YOLMEH, M.; KHOMEIRI, M.; GHAEMI, E. High-efficiency anti-enterotoxigenic activity of *Lactobacillus* on staphylococcal enterotoxins biosynthesis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 125, p. 109266, 2020.

YOUSSEF, C. R. B.; KADRY, A. A.; EL-GANINY, A. M. The alarming coincidence of toxin genes with staphylococcal cassette Chromosome mec (SCCmec) in clinical MRSA isolates. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2022.

ZAYDA, M.G. *et al.* Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis and Egyptian raw milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 104, p. 104646, 2020.

ZDENKOVA, K. *et al.* Transcriptomic and metabolic responses of *Staphylococcus aureus* in mixed culture with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus durans* in milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 9, p. 1237–1247, 2016.

ZEINHOM, M.M.A.; ABED, A.H. Prevalence, characterization, and control of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and Egyptian soft cheese. **Journal of veterinary medical research**, v. 27, p. 152-160, 2021.

ZELNY, R. *et al.* Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, p. 241-246, 2015.

ZHANEL, G.G. *et al.* Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007–11 study. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 7-22, 2013.

ZHANG, D-F. *et al.* Identification and characterization of two novel superantigens among *Staphylococcus aureus* complexes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, p. 438-446, 2018.

ZHAO, J. *et al.* AlphaLISA for detection of staphylococcal enterotoxin B free from interference by protein A. **Toxins**, v. 165, p. 62-68, 2019

ZHAO, Y.; XIA, D.; MA, P.; GAO, X.; KANG, W.; WEI, J. Advances in the detection of virulence genes of *Staphylococcus aureus* originate from food. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, p. 40-44, 2020.

ZHENG, X. *et al.* Diversity and potential function of bacterial communities during milk fermentation of Kazak artisanal cheese. **Process Biochemistry**, v. 111, n. P2, p. 191–200, 2021.

ZHU, Y.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. **Food Control**, v. 123, p. 107856, 2021.

ZHU, W. *et al.* Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 117, p. 14–17, 2015.

ZOMMITI, M. *et al.* Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018.

ZIUZINA, D.; LOS, A.; BOURKE, P. Inactivation of *staphylococcus aureus* in foods by thermal and nonthermal control strategies. In **Staphylococcus aureus**, cap.12, p. 235-255, 2018.

## ANEXO I -- Primeira página do Artigo de Revisão da Literatura publicado no periódico *Journal of Dairy Science*, v. 105, p. 5685–5699, 2022.



J. Dairy Sci. 105:5685–5699

<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21634>

© 2022, The Authors. Published by Elsevier Inc. and FASS Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Graduate Student Literature Review: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses\*

Renata Amanda Carneiro Aguiar,<sup>1†</sup> Fabienne Antunes Ferreira,<sup>2</sup> Ricardo Souza Dias,<sup>3</sup> Luís Augusto Nero,<sup>4</sup> Marília Miotto,<sup>1</sup> Silvani Verruck,<sup>1</sup> Ivan De Marco,<sup>1</sup> and Juliano De Dea Lindner<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Laboratório de Enterotoxinas, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG), 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup>InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, MG, Brazil

#### ABSTRACT

More than 30 types of artisanal cheeses are known in Brazil; however, microorganisms, such as *Staphylococcus* spp., can contaminate raw milk cheeses through different sources, from milking to processing. Staphylococcal food poisoning results from the consumption of food in which coagulase-positive staphylococci, mostly *Staphylococcus aureus*, have developed and produced enterotoxins. In addition, an emerging public health concern is the increasing antimicrobial resistance of some *Staphylococcus* strains. Furthermore, the ability of *Staphylococcus* spp. in sharing antibiotic resistance-related genes with other bacteria increases this problem. In light of these observations, this review aims to discuss the presence of, enterotoxins of, and antibiotic-resistant of *Staphylococcus* spp. in Brazilian artisanal cheese produced with raw milk.

**Key words:** virulence profile, artisan cheese, food safety, staphylococcal enterotoxin

#### INTRODUCTION

Brazil stands out for being the fourth largest cheese producer in the world, producing approximately 804 thousand tonnes of cheese per year, with this number in continuous growth (ABIQ, 2021). More than 30 types of artisanal cheeses are known in Brazil. Brazilian artisanal cheeses are those made by traditional methods that have territorial, regional, or cultural attachment and value and that respect the elaboration protocols

established for each variety, generally produced from raw milk (Brazil, 2019a).

The current trend toward the consumption of natural, less processed, and clean label products is related to the potential consumption of raw milk in countries where this regulatory possibility exists (e.g., United States, Italy). Although, in Italy, for example, it is recommended to boil raw milk before consumption. This is supported by a biased public perception that raw milk is associated with nutritional benefits which are supposedly lost after thermal processing. In the same way, cheeses produced with raw milk gain relevant importance in this context. Due to the need to regulate the production of artisanal cheese made from raw milk, the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA) published the Normative Instruction No. 30 dated August 7, 2013 (Brazil, 2013). This regulation allows the production of artisanal cheese made from raw milk with less than 60 d of ripening if it meets some requirements, such as technical-scientific studies proving that the reduction in ripening time does not affect product quality and safety (Brazil, 2013). In addition, Decree No. 9,013 dated March 29, 2017, which provides regulation for the industrial and sanitary inspection of animal-based products, excludes the obligation to pasteurize milk meant for production of cheese when exposed to a ripening process at a temperature above 5°C during a period of 60 d or less, if safety is proven through analytical tests (Brazil, 2017).

The concern of the regulatory agencies with the minimum ripening time derives from the potential for the development of pathogenic bacteria in raw milk products. Pathogens can contaminate raw milk cheese through different sources, such as the raw milk itself, but also the dairy environment (from milking to processing) and people having close contact with milk and cheeses during production and distribution (Rola et al.,

Received November 27, 2021.

Accepted March 22, 2022.

\*Submitted to the 2023 ADSA Foundation Graduate Student Literature Review Competition (Production, PhD) on March 29, 2022.

†Corresponding author: [renata.amanda28@gmail.com](mailto:renata.amanda28@gmail.com)

‡Adviser: [juliano.lindner@ufsc.br](mailto:juliano.lindner@ufsc.br).