

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra

Ana Paulina Arellano Pineda

Dissertação para obtenção do Título de Doutora

Orientador: Prof. Dr Uelinton Manoel Pinto

Coorientadora: Prof. Dra. Natalia Cristina Cirone Silva

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

**Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos
artesanais da Serra da Canastra**

Ana Paulina Arellano Pineda

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

Coorientadora: Prof. Dra. Natalia Cristina Cirone Silva

São Paulo
2022

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P579c Pineda , Ana Paulina
Caracterização Molecular de Staphylococcus aureus isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra. / Ana Paulina Pineda . - São Paulo, 2022. 101 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Orientador: Pinto, Uelinton Manoel
Coorientador: Cirone , Nathalia

1. Staphylococcus aureus. 2. Queijo da Canastra. 3. Fatores de virulência. 4. Resistência a antibióticos. I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel , orientador. III. Cirone , Nathalia , coorientador.

Ana Paulina Arellano Pineda

Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Doutora

Prof. Dr.

orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

AGRADECIMENTOS:

À professora Bernadette D.G.M Franco, por ter me dado a oportunidade de entrar no doutorado e por todos os ensinamentos.

Ao meu orientador o professor Uelinton M. Pinto, por ser parte desta etapa importante da minha vida, pela ajuda e aprendizados.

À professora Nathalia Cirone pela coorientação e contribuição no trabalho.

À Ximena Valencia, amiga incondicional que desde o primeiro dia que cheguei no laboratório tem me ajudado e contribuído com meu trabalho de doutorado.

À Gabriela Zampieri, que cedeu os isolados para a realização do trabalho, pela ajuda e contribuição no artigo de revisão e pelo apoio nessa etapa final.

Ao Gustavo Lacorte, que auxiliou na obtenção das amostras de queijo.

Ao Ruy Chacon, amigo que esteve sempre aí para dar sugestões para melhorar o meu trabalho.

Ao professor Antonio Piantino e a professora Claudette Astolfi-Ferreira, pelas conversas e conselhos, e por aceitar me orientar no projeto de *E. coli*.

Às minhas amigas Emília França, Catarina Angeli e Ximena Valencia pela amizade e ajuda dentro e fora do laboratório.

À Katia Leani e a dona Lúcia, por todos os ensinamentos e ajuda no laboratório.

À professora Rose Zanella e Carlos Camargo, do Centro de Bacteriologia no Instituto Adolfo Lutz, pela ajuda para a realização do PFGE – Eletroforese de campo pulsado.

Ao FORC (Food Research Center) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu noivo Josue, que com muito amor sempre me apoiou e me deu forças para continuar.

RESUMO

PINEDA, A. P. A. **Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra**. 2020. 101 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O queijo Minas Artesanal da Canastra é produzido na Serra da Canastra (MG), utilizando leite cru, coalho e pingo, que é uma cultura endógena natural de cada queijaria. Devido ao uso de leite cru, o produto pode veicular microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos, como *Staphylococcus aureus*. A caracterização molecular é uma ferramenta importante para avaliar a população microbiana do alimento e direcionar a aplicação de medidas de controle na produção. Este estudo caracterizou a diversidade genética, o potencial de virulência e determinou o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de queijos produzidos na Serra da Canastra. Para o estudo transversal foram analisados 248 isolados de queijos que tinham um tempo de maturação de 22 dias, provenientes de 83 propriedades. Por outro lado, no estudo longitudinal foram analisados outros 197 isolados coletados ao longo do processo de maturação, provenientes de três propriedades. Os isolados foram submetidos a testes bioquímicos para confirmação do gênero e para a confirmação da espécie de *S. aureus*, foi identificado o gene *nuc* por meio da técnica de PCR. Além disso, foi pesquisado o gene *mecA* para a detecção de *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA). Após os testes de confirmação, 144 isolados do estudo transversal e 159 do estudo longitudinal foram positivos para o gene *nuc*, específico para *S. aureus*. Posteriormente, o perfil clonal foi determinado por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) utilizando a enzima *Sma*I e tipagem do locus *agr* por PCR multiplex. A análise por PFGE foi realizada no programa BioNumerics. A técnica PCR foi realizada para identificar a presença de genes que codificam a produção de hemolisinas, toxina TSST-1, enterotoxinas “SEs” (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEO, SEM), formação de biofilme e Componentes Microbianos de Superfície que Reconhecem a Matriz de Moléculas Adesivas (MSCRAMMs). Os isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco de difusão. Por último, a formação de biofilme em microplaca de 96 poços, em caldo TSB a 37°C, foi verificada pela metodologia de Cristal Violeta. O gene *mecA* foi detectado em 1,9% dos 445 isolados. A tipagem *agr*

revelou que 83 (27,4%) dos isolados são do tipo *agr-I*, 95 (31,4%) *agr-II* e 43 (14,2%) *agr-III*, sendo que não foram detectados isolados classificados como *agr-IV*. A tipagem por PFGE revelou um total de 54 perfis. Assim, um isolado representativo de cada perfil foi utilizado nos demais testes que mostraram a presença dos genótipos *spa* mais frequentes t127 e t605 (20,58%); t002 (14,70%), seguidos pelos tipos t267 (8,82%); t1234 e t693 (5,8%) e t021, t177, t306, t321, t359, t442, t521, t693 e t5493 (2,9%). Além disso, encontramos a presença dos genes do grupo SEs, *sea* 1 (1,8%), *seh* 11 (20,3%), *sei* 10 (18,5%), *sej* 7 (12,9%), *seg* e *seo* 14 (25,9%), *sem* 8 (14,8%), e os genes *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* não foram detectados. Para os genes das hemolisinas, *hla* foi positivo em todos os isolados e *hlb* foi positivo em 53 (98,1%) isolados. Os genes positivos para MSCRAMMS foram *fnbA*, *fnbB* 18 (33,3%), *clfA*, *clfB* e *eno* 53 (98,1%), *fib* 44 (81,4%), *bbp* 4 (7,4%), *cna* 17 (31,4%) e *ebps* 10 (18,5%). Por último, os genes de formação de biofilme *icaA* e *icaD* estiveram presentes em 38 (70,3%) e 25 (46,2%) dos isolados, respectivamente. Na avaliação de susceptibilidade a antibióticos dos 54 isolados escolhidos, 25 (46,3%) apresentaram maior resistência a penicilina e 13 (24,0%) a tetraciclina. Em menor porcentagem (1,8%), 1 isolado cada foi resistente a eritromicina, cefoxitina, clindamicina, gentamicina, cotrimazol, azitromicina e trimetropim. Além disso, 8 isolados (14,8%) apresentaram resistência intermediária a tetraciclina, 3 (5,5%) a gentamicina e 1 (1,8%) a tobramicina. No teste para a determinação da formação de biofilme por cristal violeta, 13,7% foram classificados em isolados não formadores, 60,8% em fracamente formadores, 25,5% moderadamente formadores e nenhum como fortemente formador. A alta diversidade de cepas de *S. aureus* observada neste estudo mostrou que existem vários tipos de linhagens circulando na região da Canastra. A caracterização revelou uma elevada frequência de genes de virulência e que mais estudos são necessários para avaliar o potencial de produção de enterotoxinas nos queijos artesanais. A melhora dos procedimentos de higienização durante todas as etapas de produção pode ser uma solução para a redução dos níveis de contaminação por *S. aureus*.

Palavras – Chave: *Staphylococcus aureus*; Queijo da Canastra; Fatores de virulência; Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

PINEDA, A.P.A. **Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheeses from Serra da Canastra.** 2022. 101 p. Thesis (Doctorate) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Canastra Minas Artesanal cheese is produced in Serra da Canastra (MG), using raw milk, rennet and a natural endogenous culture called *pingo*. Due to the use of raw milk, the product can carry microorganisms that cause foodborne diseases, such as *Staphylococcus aureus*. Molecular characterization is an important tool to assess the microbial population of food and guide the application of control measures in production. This study characterized the genetic diversity, virulence potential and determined the antimicrobial susceptibility profile of *S. aureus* isolated from cheeses produced in Serra da Canastra. A total of 248 isolates from 22 days ripened cheeses were obtained from 83 properties (cross sectional study). Another 197 isolates were collected during maturation (longitudinal study), in three properties. The isolates were submitted to biochemical tests to confirm the genus and to confirm the *S. aureus* species, the *nuc* gene was identified by PCR. In addition, the detection of *mecA* gene was performed for the detection of Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA). After confirmation tests, 144 isolates from the cross-sectional study and 159 from the longitudinal study were positive for the *nuc* gene, specific for *S. aureus*. Subsequently, the clonal profile of the isolates was determined by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) using the *Sma*I enzyme and typing of the *agr* locus by multiplex PCR. PFGE analysis was performed using the BioNumerics program. PCR was performed to identify the presence of genes encoding the production of hemolysins, TSST-1 toxin, enterotoxins “SEs” (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEO, SEM), biofilm formation and microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs). The isolates were submitted to the antimicrobial susceptibility test by disc diffusion. Finally, biofilm formation in a 96-well microplate in TSB broth at 37°C was verified by the Cristal Violeta method. The *mecA* gene was detected in 1.9% of the 445 isolates. *Agr* typing revealed that 83 (27.4%) of the isolates are *agr*-I, 95 (31.4%) *agr*-II and 43 (14.2%) *agr*-III, and no isolate was classified as *agr*-IV. PFGE typing revealed a total of 54 profiles. Thus, a representative isolate of each profile was used in the other tests that showed the presence of the most frequent spa

genotypes t127, t605 (20.58%); t002 (14.70%), followed by types t267 (8.82%); t1234, t693 (5.8%) e t021, t177, t306, t321, t359, t442, t521, t693 and t5493 (2.9%). In addition, we found the presence of the genes of the SEs group: *sea* 1 (1.8%), *seh* 11 (20.3%), *sei* 10 (18.5%), *sej* 7 (12.9%), *seg* and *seo* 14 (25.9%), *sem* 8 (14.8%), while *seb*, *sec*, *sed*, *see* and *tst* genes were not detected. For hemolysin genes, *hla* was positive in all isolates and *hlb* was positive in 53 (98.1%) isolates. The positive genes for MSCRAMMS were: *fnbA*, *fnbB* 18 (33.3%), *clfA*, *clfB* e *eno* 53 (98.1%), *fib* 44 (81.4%), *bbp* 4 (7.4%), *cna* 17 (31.4%) and *ebps* 10 (18.5%). Finally, the biofilm formation genes *icaA* and *icaD* were present in 38 (70.3%) and 25 (46.2%) of the isolates, respectively. In the evaluation of antibiotic susceptibility of the 54 isolates, 25 (46.3%) showed greater resistance to penicillin and 13 (24.0%) to tetracycline. In a lower percentage (1.8%), 1 isolate each was resistant to erythromycin, cefoxitin, clindamycin, gentamicin, contrimazole, azithromycin and trimethoprim. In addition, 8 isolates (14.8%) showed intermediate resistance to tetracycline, 3 (5.5%) to gentamicin and 1 (1.8%) to tobramycin. In the test for the determination of biofilm formation by crystal violet, 13.7% were classified as non-forming isolates, 60.8% as weakly forming, 25.5% moderately forming and none as strongly forming. The high diversity of *S. aureus* strains observed in this study showed that there are several types of strains circulating in the Canastra region. The characterization revealed a high frequency of virulence genes and that further studies are needed to assess the potential for enterotoxin production in artisanal cheeses. The improvement of hygiene procedures during all stages of production can be a solution for reducing the levels of contamination by *S. aureus*.

Key Words: *Staphylococcus aureus*; Canasta cheese; Virulence factors; Antibiotic resistance.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> : genes, função e quadro clínico.	31
---	----

FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de elaboração do queijo Minas Artesanal.	21
Figura 2 - Mapa funcional do sistema regulador gênico acessório (<i>agr</i>) em <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura 3 - Representação esquemática da técnica PFGE	46
Figura 4 - Esquema do teste para avaliar a formação de biofilme	54
Figura 5 - Esquema representativo do teste de sensibilidade a antimicrobianos por discos de difusão.....	56
Figura 6 - Dendrograma representando o agrupamento por similaridade dos isolados de <i>S. aureus</i> , dos isolados do estudo longitudinal e transversal em conjunto, após clivagem do DNA total com <i>Sma</i> I e separação por PFGE.	62
Figura 7 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizando a enzima de restrição <i>Sma</i> I em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Figura 8 - Gráfico representativo da formação de biofilme por isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de queijo artesanal da Canastra.	69

TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para o gene <i>nuc</i>	44
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para tipagem do locus <i>agr</i>	45
Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para tipagem da região <i>spa</i>	49
Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes de virulência dos isolados de <i>S. aureus</i>	50
Tabela 5 - Genes envolvidos na formação de biofilme e seus respectivos oligonucleotídeos.	52
Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos de genes que codificam MSCRAMMs.	52
Tabela 7 - Detecção de isolados de MRSA.	53
Tabela 8 - Parâmetros CLSI 2019 para interpretação de halos de inibição para <i>S. aureus</i>	57
Tabela 9 - Tipos de <i>agr</i> encontrados nos isolados de <i>S. aureus</i> , nos estudos longitudinal e transversal.	58
Tabela 10 - Prevalência de genes codificadores de SAGs e hemolisinas71	71
Tabela 11 - Prevalência de genes codificadores de proteínas de membrana.74	74
Tabela 12 - Resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>79	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1. Queijo Minas Artesanal da Canastra	18
3.2. Prevalência e surtos ocorridos por <i>Staphylococcus aureus</i> pelo consumo de queijos artesanais e produtos lácteos	24
3.3. Características morfológicas funcionais de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.4. Características genéticas de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.5. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.5.1. Coagulase	32
3.5.2. Toxinas com atividade de superantígeno (SAg).....	32
3.5.2.1. Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs)	33
3.5.2.2. Síndrome do Choque Tóxico (TSST)	34
3.5.3. Citotoxinas Hemolíticas	34
3.5.4. Proteína A	35
3.5.5. Componentes da Superfície Microbiana que reconhecem as Moléculas Adesivas da Matriz Celular (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules - MSCRAMMs).....	36

3.5.6. Biofilme.....	36
3.6. Resistência a Antibióticos.....	38
3.7. Caracterização de <i>Staphylococcus aureus</i> por Técnicas de Tipagem Molecular	38
3.7.1. Locus <i>agr</i>	38
3.7.2. Tipagem por <i>spa typing</i>	40
3.7.3. Tipagem por Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE).....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Origem dos isolados bacterianos e isolamento de <i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	42
4.2. Origem das cepas controle.....	43
4.3. Identificação de <i>S. aureus</i> por PCR convencional.....	43
4.3.1. Extração de DNA bacteriano	43
4.3.2. Amplificação por PCR	43
4.3.3. Caracterização molecular dos isolados por PCR convencional	44
4.3.4. Pesquisa de fatores de virulência.....	49
4.3.5. Pesquisa do gene codificador de resistência a meticilina.....	53
4.4. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.4.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados por meio do ensaio de cristal violeta	53
4.4.2. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos	55

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Identificação dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
5.2. Perfil de clonalidade dos isolados.....	58
5.2.1. Tipagem <i>agr</i>	58
5.2.2. Análise da clonalidade dos isolados por PFGE	59
5.2.3. Tipagem <i>spa</i>	69
5.3. Pesquisa de fatores de virulência	70
5.3.1. Pesquisa de genes que codificam toxinas do grupo SAg e hemolisinas ..	70
5.3.2. Avaliação genotípica e fenotípica da produção de biofilme	73
5.4. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	78
6. CONCLUSÃO	79
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	81
8. ANEXOS	100
8.1. Anexo 1 – Origem das cepas controle.....	100
8.2. Anexo 2 - Publicação do artigo de Revisão	101

1. INTRODUÇÃO

A produção de queijo Minas Artesanal da Canastra é de grande importância econômica, social e cultural para a região. Trata-se de um produto conhecido nacionalmente e de grande apelo comercial. Além disso, é a principal fonte renda e emprego para boa parte da população da região da Serra da Canastra.

O queijo minas artesanal da Canastra é um produto feito de leite cru, manipulado ao longo do processo de produção e em alguns casos elaborado em condições higiênico-sanitárias deficientes, resultando em um produto sem padronização (PINEDA et al., 2021). A segurança microbiológica deste alimento é de grande preocupação para a saúde pública, já que apresenta um alto risco de contaminação por patógenos como o *Staphylococcus aureus* que pode causar intoxicação alimentar, devido à produção de enterotoxinas (CAMARGO et al., 2021, ALLAION; BARRIONUEVO; FRANCO, 2021).

Vários estudos mostram a presença de fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* como: leucocidinas, hemolisinas, superantígenos (toxinas exfoliatinas, TSST-1 e enterotoxinas), e componentes da parede celular, que foram detectados em isolados provenientes de leite cru (ALLAION; BARRIONUEVO; FRANCO, 2021; NORMANNO et al., 2005; BERGDOLL, M.S. & WONG, 2006; D'AMICO; DONNELLY, 2011).

Esse microrganismo encontra-se amplamente distribuído na natureza, podendo chegar até o alimento por meio dos manipuladores com práticas de manuseio deficientes, equipamentos de ordenhas, e pele de animais (VANETTI; PINTO, 2013; REGASA; MENGISTU; ABRAHA, 2019). Além disso, a mastite, que é uma doença comum em vacas leiteiras, afeta a qualidade do leite e resulta nesta matéria-prima contaminada (CHENG, W.N.; HAN, S.G., 2020). Outra fonte de contaminação é a formação de biofilmes nos locais de processamento de alimentos que é responsável por perdas econômicas (GIAOURIS et al., 2014).

Devido ao risco pelo consumo de alimentos contaminados por *S. aureus*, entidades governamentais de vários países exigem a pesquisa e enumeração desse

microrganismo como parte das ações de fiscalização sanitária. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta grande relevância devido a produção e consumo de queijo minas artesanal no Brasil. A aplicação de técnicas moleculares na caracterização de *S. aureus* é um passo importante para se conhecer o potencial de virulência e diversidade microbiana encontrada em queijo minas artesanal da Canastra.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

- Caracterizar a diversidade genética, potencial de virulência e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de Queijo Minas Artesanal da Canastra.

2.2. Objetivos específicos

- Confirmar a identidade dos isolados mediante detecção do gene *nuc* por PCR e por testes bioquímicos;
- Verificar a diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos maturados com 22 dias de 83 propriedades da canastra e de queijos durante a maturação em três propriedades;
- Detectar a presença de genes de virulência e resistência a meticilina nos isolados;
- Avaliar o perfil de resistência a agentes antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilmes dos isolados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Queijo Minas Artesanal da Canastra

O queijo é um alimento que faz parte do cardápio da população brasileira e representa quase 10% dos lácteos consumidos no país. O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor de queijos do Brasil, com 40% da produção nacional (AMARANTE, 2015; ABIQ, 2019; EMBRAPA, 2022).

Segundo a Portaria do IMA nº 1969 de 26 de março de 2020, queijos Artesanais de Minas Gerais são aqueles “elaborados, a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo), e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânica. Além disso, o processamento deverá iniciar-se em até noventa minutos após o começo da ordenha; fabricação deverá ser com leite que não tenha sofrido tratamento térmico; utilização como ingredientes de culturas lácticas naturais como pingo, soro fermentado ou soro-fermento, coalho e sal; e o período de maturação, conforme o período estipulado para as microrregiões que possuam pesquisas científicas ou, na sua ausência, pelo maior período determinado por meio dos estudos científicos” (MINAS GERAIS, 2020).

O queijo Minas Artesanal (QMA) é um produto tradicional, fabricado por pequenos produtores, de significativa importância socioeconômica e gerador de renda e emprego para grande parte dos agricultores familiares do estado (DORES; FERREIRA, 2012). A região da Serra da Canastra tem cerca de 800 produtores artesanais, que produzem cerca de 576 toneladas de queijo por ano (FIERN, 2020).

A região da Serra da Canastra está situada no sudoeste de Minas Gerais, sendo reconhecida como produtora de QMA por mais de dois séculos (MINAS GERAIS, 2018). O queijo Canastra foi declarado, desde maio de 2008, como patrimônio cultural imaterial Brasileiro, título concedido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) por reunir tradição, cultura e possuir características peculiares desde que começou a ser fabricado no século XVIII. É produzido há mais de 200 anos no Brasil e o processo de fabricação tem sido passado de geração em geração (JÚNIOR C. G. et al., 2014).

A Serra da Canastra é uma região que tem o *terroir* ideal para a produção do queijo. O *terroir* é a união das condições físico-ambientais como clima, altitude, pastos nativos e águas favoráveis à produção de queijo. Apresenta um ambiente propício ao desenvolvimento de bactérias típicas como bactérias lácticas principalmente *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* que promovem o aroma, sabor e textura característico do queijo (SEBRAE, 2016; PINEDA et al., 2021).

Somente os queijos artesanais produzidos nos municípios de Medeiros, São Roque de Minas, Vargem Bonita e algumas regiões dos municípios de Piumhi, Delfinópolis, Bambuí, Tapiraí, São João Batista do Glória e Córrego D'Anta, podem utilizar a denominação “Queijo Minas Artesanal da Canastra”. Tal designação se dá pela certificação de registro de Indicação Geográfica do Queijo Minas Artesanal Canastra dada pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (MINAS GERAIS, 2018)

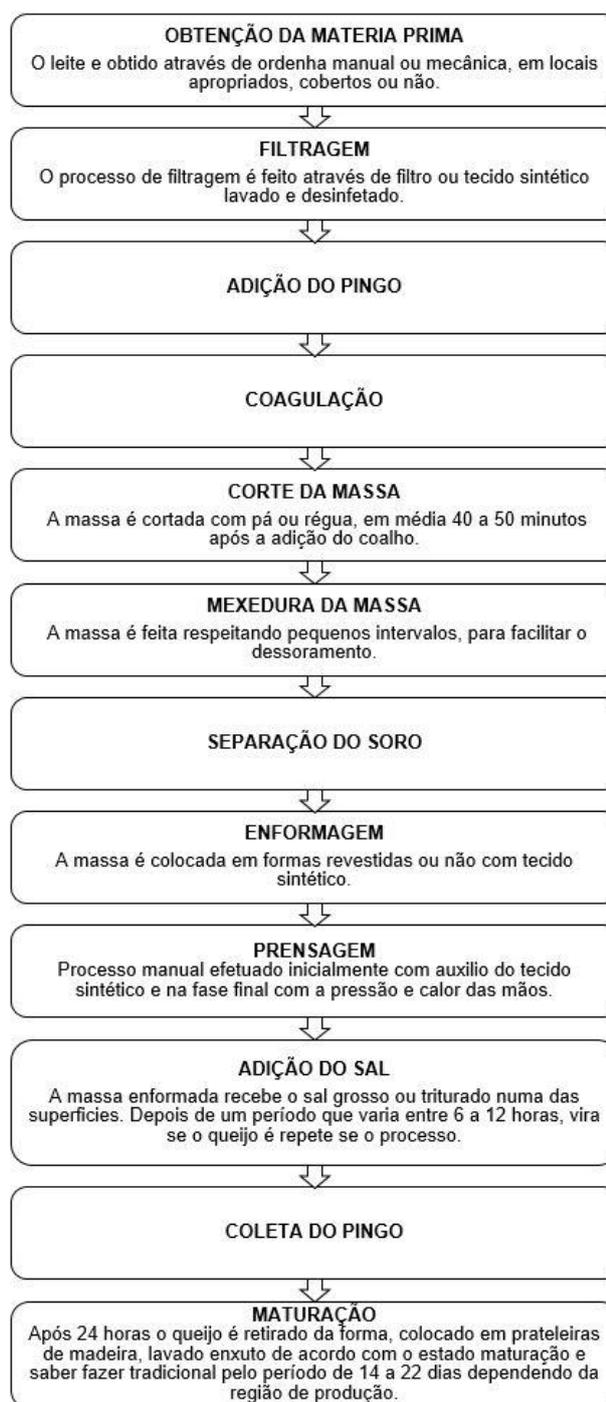
O queijo da Serra da Canastra, assim como os queijos artesanais produzidos em outras regiões reconhecidas como a de Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro, são fabricados com leite cru recém-ordenhado. O leite cru apresenta uma microbiota complexa, podendo apresentar microrganismos desejáveis como bactérias lácticas e indesejáveis como deterioradores e patógenos (LIMA et al., 2009; CARDOSO et al., 2013; PERIN et al., 2017).

Na elaboração do queijo Canastra, além do uso de leite cru e fermento lácteo ou pingo (obtido do soro da produção de queijo do dia anterior), também se utiliza o coalho industrializado e cloreto de sódio (sal comum). Segundo a Portaria nº 2.051, de 08 de abril de 2021, as queijarias podem comercializar o queijo Canastra somente após o período mínimo de maturação de 14 dias (MINAS GERAIS, 2021). Vale ressaltar que no ano de 2017, período em que esse trabalho foi iniciado, o tempo obrigatório de maturação para o queijo Canastra era de 22 dias (MINAS GERAIS, 2013). Segundo a EMATER, o produto apresenta “consistência semi-dura com tendência à macia, de natureza manteigosa, textura compacta e encorpada, coloração branca-amarelada, crosta fina, amarelada e lisa, com formato cilíndrico, com 4 a 7 cm de altura, 15 a 17 cm de diâmetro, 1,0 a 1,2 kg de peso total e odor e sabor forte, ligeiramente ácido, meio picante e agradável” (MINAS GERAIS, 2018)

Existe uma maneira própria de cada produtor elaborar os queijos, que vai desde o sistema de criação e tipo do rebanho, práticas de manejo sanitário e alimentar, até sua posterior maturação. As distintas técnicas de fabricação, bem como a umidade relativa, a temperatura ambiente ou da câmara de maturação, são fatores que apresentam variações entre os produtores e as regiões. Tudo isso dificulta uma padronização do produto e em contrapartida, se obtém um produto final com sabores, texturas e aparências distintas entre diferentes fazendas (MACHADO et al., 2004).

O processo de produção do queijo da Canastra compreende as seguintes etapas: filtração do leite; adição de cultura láctica (pinto) e coalho; coagulação; corte da massa; mexedura; dessoragem; enformagem; prensagem manual; salga seca e maturação (MINAS GERAIS, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de elaboração do queijo Minas Artesanal.



Fonte: Portaria do IMA nº 1969 de 26 de março de 2020 (MINAS GERAIS, 2020)

A primeira etapa na produção do queijo é a ordenha do leite, na qual pode-se minimizar a contaminação microbiológica pela aplicação de boas práticas de ordenha. Nesta etapa, é necessário avaliar a saúde das glândulas mamárias, higienização dos equipamentos e do local, assim como a lavagem das mãos do ordenhador, realização

de pré e pós *dipping* e uso de papel toalha para a secagem dos tetos (TORRES, 2014). Falhas nesta etapa podem provocar a disseminação de agentes de mastite entre os animais. A mastite é um processo infeccioso que atinge a glândula mamária e produz alterações na secreção e composição do leite (DIAS, 2007). Agentes bacterianos responsáveis pela mastite são, entre outros, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Streptococcus uberis* e *S. dysgalactiae* (CHENG, W.N.; HAN, S.G., 2020).

As medidas empregadas para o controle de mastite causada por *S. aureus* não têm sido totalmente eficazes, provavelmente devido à falta de conhecimento sobre os diversos fatores de virulência que são responsáveis pelo processo de infecção e sobre as vias de transmissão, fontes de infecção, vetores e mecanismos de disseminação (RAINARD et al., 2018).

A fabricação do queijo Canastra deve ocorrer em até 90 minutos após a ordenha do leite, momento no qual inicia-se a etapa de filtragem, que tem como objetivo retirar partículas macroscópicas. Depois, adiciona-se o fermento natural obtido do dia anterior, “pingo”, além do coalho. O coalho pode ser em pó, ou líquido de renina de bezerro. A quantidade de pingo adicionado pode variar de 100 a 500 ml para 100 litros de leite, de acordo com a estação do ano, temperatura ambiente, e a maneira de produção de cada produtor (MINAS GERAIS, 2012).

A etapa de coagulação dura em média de 40 a 90 minutos para o Queijo Canastra, Canastra Merendeiro e Canastra Real, de acordo com diversos fatores como: temperatura ambiente, dose de coalho e pingo, composição do leite, estação do ano, entre outros. Após a coagulação do leite, inicia-se a etapa de corte da massa até a obtenção do tamanho dos grãos desejados. Após o corte, o tempo de mexedura varia entre 1 e 5 minutos, de acordo com a maneira de elaboração de cada produtor. Na separação da massa do soro, a massa fica em descanso para que ocorra a dessoragem (MINAS GERAIS, 2012).

Na etapa de enformagem, a massa é colocada em formas plásticas e o artesão prensa manualmente a massa, à fim de dessorá-la e compactá-la. Após a prensagem manual, deve-se deixar os dois lados lisos e homogêneos. A etapa de salga à seco é

o momento em que uma das faces do queijo é coberta com uma camada de sal. A primeira etapa da salga demora aproximadamente de 6 a 8 horas, depois o queijo é virado e a outra face é salgada por mais 18 horas. Nessa etapa, ocorre também a coleta do “pingo”, que será utilizado na produção do queijo do dia seguinte (BORELLI et al., 2006; MINAS GERAIS, 2012).

A maturação do Queijo Minas artesanal da Canastra deve ser à temperatura ambiente ou em ambiente de temperatura controlada, localizada na zona delimitada de produção, obedecendo ao modo tradicional de fabricação e à legislação vigente. O período de maturação deverá ser de no mínimo 14 dias (MINAS GERAIS, 2021). Essa fase é responsável pela cor, sabor, aroma e textura característicos do queijo artesanal devido a alterações bioquímicas, como lipólise, proteólise e glicólise. Além disso, contribui no controle de microrganismos como *S. aureus*, *E. coli* e coliformes totais (FOX; COGAN, 2004; DORES, 2007; SILVA GUIMARÃES, 2007; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013).

Nos aspectos microbiológicos de cada queijo produzido artesanalmente, há uma microbiota endógena específica que combinada com o solo, água, pastagem, clima e altitude caracterizam o queijo sensorialmente e permitem conservar o valor do produto. A microbiota nativa, formada principalmente por bactérias lácticas e leveduras presentes no leite e no “pingo”, é de grande importância para as características sensoriais do produto final (FOX; COGAN, 2004).

O queijo é rico em nutrientes e possui valores de pH e atividade de água (a_w) favoráveis à multiplicação dos microrganismos. Portanto, muito susceptível à contaminação microbiana, sobrevivência e multiplicação dos mesmos que dependendo da espécie, pode ocasionar surtos de infecção ou intoxicação de origem alimentar. Esta situação é agravada quando se emprega o leite cru, principal matéria-prima para a fabricação do Queijo Canastra, aliado a intensa manipulação no processo de obtenção e, em geral, à falta de atenção ao tempo de maturação necessário. Outros fatores como as condições sanitárias dos rebanhos, as condições higiênico-sanitárias de fabricação, transporte e comercialização, bem como o tempo e temperatura de conservação de produtos na estocagem e o uso de tecnologias

inadequadas também podem influenciar na segurança do produto (PINTO, 2004; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PINTO et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2015).

Vários estudos mostraram a presença de microrganismos patogênicos em queijos artesanais como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, e altas contagens de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo os mais comuns e importantes no controle da qualidade de tais produtos *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella spp.* (BORELLI et al., 2006; NÓBREGA, 2007; ORNELAS et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2015; MARTINS et al., 2015; VAN CAUTEREN et al., 2017).

Um estudo realizado com QMA na região do Serro mostrou também que as populações de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus coagulase positivo* (SCP) foram altas no leite utilizado para fabricação destes queijos (FIGUEIREDO et al., 2015). Provavelmente, o crescimento de *S. aureus* pode ocorrer durante o armazenamento de leite em temperaturas altas, ou nas primeiras etapas de fabricação de queijo, se o microrganismo não for inibido pela atividade das bactérias lácticas (CHARLIER et al., 2009). Além disso, o nível máximo de contaminação de *S. aureus* em queijo de leite cru foi observado nas primeiras horas após a sua produção (JAKOBSEN et al., 2011; CAMPOS, 2019).

3.2. Prevalência e surtos ocorridos por *Staphylococcus aureus* pelo consumo de queijos artesanais e produtos lácteos

Segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (2022) no Brasil, entre os anos de 2012 a 2021, obteve-se o registro de 6.347 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), sendo responsável de 13.466 hospitalizações. Nos casos em que se determinou o agente etiológico, os mais comuns foram bactérias, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, coliformes. Dentre as classes de alimentos incriminados nos surtos, vale destacar o leite e seus derivados com uma proporção de 7,1%. Por outro lado, *S. aureus* representa o 12,9% dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos (MINISTERIO DA SAÚDE, 2022).

A intoxicação por *S. aureus* é causada pelo consumo de alimentos que contém toxinas pré-formadas produzidas pelo microrganismo, e os sintomas iniciam-se rapidamente após a ingestão dos alimentos contaminados, aproximadamente de 30 minutos a 5 horas (VANETTI; PINTO, 2013). No entanto, o período de incubação depende da quantidade de toxina ingerida. Estudos mostram que uma concentração de 0,5 ng/g da toxina no alimento pode ser suficiente para causar intoxicação (MURRAY, 2005). Além disso, o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas são afetados por parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH, atividade de água, concentração de sal (NaCl) e disponibilidade de oxigênio (BEUCHAT; MONTVILLE; DOYLE, MICHAEL P., 2003; VIEIRA P et al., 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica dificilmente é notificada devido ao fato de os sintomas terem curta duração; por isso, raramente os afetados procuram tratamento clínico, o que faz com que o índice de hospitalização e notificação sejam baixos. Além disso, a escassez de estudos e recursos em grande parte do país, resultam mais ainda em poucos dados oficiais sobre a doença, e diagnósticos incorretos por parte dos profissionais de saúde (NERO; NOGUEIRA, 2007).

Vários estudos evidenciam a presença de genes que codificam a produção de toxinas em produtos lácteos, incluindo queijos, podendo representar um risco para os consumidores (FIGUEIROA et al., 2009; FERREIRA et al., 2016; TAREKGNE et al., 2016; LÚCIO et al., 2018). Surtos e casos esporádicos de intoxicação atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países (DO CARMO et al., 2002; JOHLER et al., 2015; ARMANI et al., 2016).

Na Itália, em 1997, foi avaliada a presença *S. aureus* em quatro tipos de queijos comercializados em Bologna, e constatou-se que 16,3% (22/135) das amostras estavam contaminadas com o patógeno (DE LUCA, ZANETTI e STAMPI 1997). Em outro trabalho, na Itália, analisaram-se leite cru e pasteurizado e outros derivados (queijo, coalhada, ricota, sorvetes, etc.). Foram isoladas 362 cepas de *S. aureus*, das quais 217 produziram as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEA e SEB, SEA e SED (NORMANNO et al. 2005). No estudo de Bellio et al. (2019), 7 amostras de queijos com maturação de 4 a 10 semanas mostraram a presença de enterotoxinas SEA e SED.

No Brasil, vários estudos demonstraram alta contaminação de leite e derivados por *S. aureus* (DAS DORES et al., 2013; SOUZA et al., 2015; DE SANT'ANNA et al., 2018). Em Minas Gerais, foram analisadas 16 amostras de queijos minas artesanais da Canastra nas estações chuvosa e seca. Os resultados mostraram altas contagens de *S. aureus*, acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação vigente. Além disso, 75% das amostras continham a enterotoxina SEA, sem influência da estação (DAS DORES et al., 2013). Em outro estudo, 37 amostras de QMA da região de Medeiros, provenientes de fazendas com certificação, apresentaram contagens de *S. aureus* em desacordo com os padrões legais (DE SANT'ANNA et al., 2018). No município de Sacramento, foram analisadas 30 amostras de QMA produzidos na região de Araxá. Todas as amostras não atenderam aos parâmetros legais, e 56 (88,8%) dos isolados pertencentes a essas amostras foram positivos para *S. aureus* (SOUZA et al., 2015). Sapata et al., (2008) realizaram a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em 48 amostras de queijo minas frescal, sendo que 38 (79,20%) amostras apresentaram valores superiores ao limite microbiológico, sugerindo que o produto não foi elaborado em condições higiênico-sanitárias adequadas. Em outro estudo Feitosa e colaboradores (2003) avaliaram a ocorrência de SCP em queijos produzidos artesanalmente no estado do Rio Grande do Norte, tendo encontrado que 72,7% das amostras apresentavam contagens entre $7,0 \times 10^4$ UFC/ g a $1,3 \times 10^8$ UFC/g.

Na França, seis surtos envolveram 23 pessoas que consumiram queijos feitos de leite cru. Foram analisadas amostras dos surtos 1, 2, 3 e 6, e um total de 20 isolados de *S. aureus* dessas amostras. Nas amostras dos surtos 1, 2 e 3, o microrganismo e as enterotoxinas SEA e SEE foram detectados; na amostra do surto 6 não foi possível isolar o microrganismo devido ao processo de aquecimento utilizado na sua preparação. No entanto, foi possível identificar a enterotoxina SEE. As amostras do surto 4 e 5 não estavam disponíveis para análise. Além disso, os 20 isolados apresentaram unicamente o gene *see* (OSTYN et al., 2010).

Na Suíça, um surto de intoxicação alimentar pela presença de enterotoxinas SED e SEA em queijos feitos de leite cru atingiu 10 crianças e 4 adultos. A cepa

identificada como responsável do surto foi associada a mastite bovina (JOHLER et al., 2015).

No Reino Unido, relataram-se a ocorrência de 359 casos de intoxicação alimentar no período de 1969 e 1990 devido a enterotoxina estafilocócica. Do total de casos, 8% ocorreram devido a ingestão de leite e derivados contaminados (SENA, 2000).

No Brasil, os surtos de DTA pesquisados envolvendo produtos lácteos têm sido associados principalmente ao consumo de queijos do tipo Minas padrão, Minas frescal, e de queijo coalho. Em Ouro Preto (MG), em julho de 1987, houve um surto devido ao queijo Minas frescal contaminado por *S. aureus* (SABIONI; HIROOKA; DE SOUZA, 1988). O nível de contaminação no queijo foi de $9,3 \times 10^7$ UFC/g e as cepas isoladas eram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB, SED e SEE. Nessa mesma cidade, ocorreu outro surto de intoxicação estafilocócica em janeiro de 1992 que foi atribuído ao consumo de queijo fabricado com leite cru. *S. aureus* foi o agente e 93,7% das cepas eram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB ou SED. Em 1996, em (MG) ocorreu outro surto atribuído a esse mesmo tipo de queijo e *S. aureus* foi o agente etiológico identificado. A população do patógeno nos queijos foi de $2,9 \times 10^8$ UFC/g, sendo detectadas cepas produtoras de enterotoxina SED (SABIONI; NASCIMENTO; PEREIRA, 1994).

Na cidade de Belo Horizonte, foram investigados 18 surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Os alimentos envolvidos foram bolo com recheio de creme (8 casos) e queijo branco (10 casos). A contagem de estafilococos variou de 10^4 a 10^8 UFC/g de alimento. Os estafilococos isolados em 14 dos surtos produziram enterotoxinas, SEA e SEB em 12 surtos, enterotoxina A em um surto e enterotoxina B em um outro surto (CARMO, L. S.; BERGDOLL, 1990).

Ainda em Minas Gerais, no ano de 1999, a presença de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru e queijo minas frescal, foi responsável por 2 surtos que atingiram 378 pessoas. No primeiro surto, foram detectadas as enterotoxinas SEA, SEB e SEC, possivelmente produzidas por *S. aureus* provenientes de manipuladores

e, no segundo surto, as enterotoxinas SEC e SED, presuntivamente de isolados de mastite bovina (DO CARMO et al., 2002).

Os estudos descritos anteriormente indicam a presença de *S. aureus* ou enterotoxinas produzidas pelo microrganismo, que apresentam um perigo de intoxicação e surtos pelo consumo desses alimentos. Também mostram que existem falhas no controle sanitário durante as etapas de produção e recomendam uma melhora na implementação de boas práticas de fabricação, assim como, a execução eficiente dos serviços de fiscalização.

Casos de surtos atribuídos ao consumo de queijos e produtos lácteos são descritos em vários países. No entanto, no Brasil, mesmo tendo estudos que identificam a presença de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, os dados sobre surtos com queijos artesanais são, ainda, inexistentes.

3.3. Características morfológicas funcionais de *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um coco Gram-positivo de 0,5 a 1,0 micrometro de diâmetro, cresce em forma de cachos de uvas, não esporulado e imóvel. As colônias são convexas, circulares e com bordas lisas, podem se apresentar opacas, podendo variar sua coloração (branca, creme, amarela) (SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017). A denominação de *S. aureus* foi adquirida pela capacidade de produzir um pigmento de cor de ouro (SHIROMA et al., 2015). Além de *S. aureus* subsp. *aureus*, existem outras espécies coagulase positivas que são: *S. hyicus* subsp. *hyicus*, *S. lutrae*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. delphini* (DA SILVA et al., 2017).

S. aureus subsp. *aureus* é um microrganismo mesófilo que cresce na faixa de 7,0 a 47,8 °C, com temperatura ótima de 37 °C. O pH de crescimento vai de 4,5 a 9,3, com ótimo de 7,0 a 7,5. Apresenta tolerância ao sal e pode crescer em meios com até 15% de NaCl. Se desenvolve em a_w mínima de 0,86 (FRANCO; LANDGRAF, 2008). É um microrganismo anaeróbico facultativo, mas apresenta um melhor crescimento em condições aeróbicas (DA SILVA et al., 2017). Além disso, produz vários fatores de virulência como proteína A, fosfatase alcalina, catalase, coagulase, “*clumping factor*”,

nuclease termoestável (termonuclease), hemolisina e lipase (DA SILVA et al., 2017; SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017).

S. aureus é um patógeno humano que causa infecções que vão desde infecções relativamente leves como pústulas, furúnculos, impetigos, até processos mais extensos e potencialmente fatais como infecção pós-cirúrgica, pneumonia, osteomielite, endocardite, abscesso cerebral, meningite, sepse e bacteremia, bem como doenças mediadas por toxinas, como síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (TONG et al., 2015). Coloniza aproximadamente um terço dos seres humanos saudáveis e é mais provavelmente encontrado nas narinas (SAKR et al., 2018). O transporte nasal de *S. aureus* é um fator de risco para doença estafilocócica. O tratamento para esse microrganismo é agravado pela disseminação do *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (AYEPOLA et al., 2015).

A espécie *S. aureus* apresenta grande relevância devido à sua facilidade de adaptação ao meio ambiente e a capacidade de trocar material genético, podendo adquirir genes de resistência a antibióticos e genes de virulência (SANTOS et al., 2018). Outra característica importante é a capacidade de formação de biofilme, devido à resistência a dessecação, ao calor e aos desinfetantes, podendo permanecer em superfícies, utensílios e equipamentos, constituindo uma importante fonte de contaminação (MIAO et al., 2019).

3.4. Características genômicas de *Staphylococcus aureus*

Na análise de sequências genômicas de *S. aureus* subsp. *aureus* observou-se que apresentava um tamanho de genoma de aproximadamente 2,8 Mb, com um conteúdo de G + C de 32% a 36% e 2748 sequências codificadoras de proteínas, além de profagos, plasmídeos e transposones (LINDSAY; HOLDEN, 2004). O cromossomo contém ilhas de patogenicidade e genes de resistência a antibióticos que podem ser adquiridos via transferência horizontal de elementos genéticos móveis (MGEs) (SHIROMA et al., 2015). O genoma de *S. aureus* é dinâmico e pode desenvolver polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e ganhar ou perder MGEs (LINDSAY; HOLDEN, 2004; SHIROMA et al., 2015).

3.5. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

A patogenicidade de *S. aureus* é multifatorial e envolve uma variedade de proteínas e toxinas que contribuem para a sua capacidade de colonização e invasão celular, degradação de células do sistema imunológico e a sua evasão, a alteração dos tecidos, assim como também influenciar na sua própria multiplicação (GORDON; LOWY, 2008).

A patogenicidade de *S. aureus* depende da quantidade de genes determinantes de fatores de virulência que estão presentes no genoma e a capacidade que têm para expressá-los. Estima-se que aproximadamente 22% do genoma de *S. aureus* varia entre os distintos clones, e que estas regiões variáveis podem incluir genes estruturais e reguladores que influenciam na capacidade adaptativa, na patogenicidade e virulência (DAVID; DAUM, 2010).

Os principais fatores de virulência são proteínas extracelulares como adesinas, exoenzimas, exotoxinas, citotoxinas e proteína A. Essas proteínas fixam-se na parede celular e permitem ao microrganismo escapar das defesas do hospedeiro, aderir-se às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro, e a se disseminar dentro dos tecidos. Sua produção é conduzida por uma cadeia complexa de funções regulatórias cuja expressão *in vitro* é programada e depende de sinais ambientais (KURODA et al., 2001; VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002; CANOVAS et al., 2016).

Os fatores de virulência produzidos por *S. aureus* podem estar envolvidos na evasão da resposta do sistema imunológico do hospedeiro, como as enterotoxinas estafilocócicas (SE), a toxina de síndrome do choque tóxico (TSST-1), polissacarídeos capsulares, a proteína A, e lipases; na adesão às células ou a matriz extracelular, como colágeno, enzima coagulase, fibronectina, fibrinogênio; e com a invasão e colonização das células do organismo, como as hemolisinas e leucocidina Panton-Valentine (PLV) (MAZMANIAN; TON-THAT; SCHNEEWIND, 2001; HAVERI et al., 2007; SANTOS et al., 2007; HOLZINGER et al., 2012) (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*: genes, função e quadro clínico.

Fator de virulência	Função	Genes associados	Quadro clínico	Referência
Leucocidinas D e E LPV	Alteração da permeabilidade celular, destruição leucocitária. Causa lise de fagócitos	<i>LukS-PV</i> e <i>LukF-PV</i>	Alterações cutâneas invasivas, pneumonia necrotizante e destruição de tecidos e células	(DARBOE et al., 2019)
Hemolisinas	Formação de poros e posterior ruptura de membranas celulares	<i>hla, hlb, hld, hlg,</i>		(MONECKE et al., 2014; ACOSTA et al., 2018)
Toxina TSST-1	Síndrome de Choque Tóxico	<i>tst</i>	Síndrome de choque tóxico, síndrome da pele escaldada estafilocócica, intoxicação alimentar e sepse	(ACOSTA et al., 2018; BENKERROUM, 2018)
Enterotoxinas	Intoxicação alimentar Enterotoxinas <i>like</i>	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seu</i>		
Proteínas de ligação à fibronectina e colágeno	Adesão ao fibrinogênio imobilizado e evasão imune mediante a união ao fibrinogênio solúvel Adesão a células epiteliais de descamação e favorece a colonização nasal	<i>clfA</i> <i>clfB</i>	Endocardite, osteomielite, artrite séptica, e infecções relacionadas aos dispositivos médicos	
Proteína ligadora a fibronectina	Adesão a matriz celular e posterior invasão	<i>fnbA, fnbB</i>	Infeção em reação de corpo estranho, mastite, endocardite	
Proteína de adesão à elastina	Codifica a proteína de ligação à elastina Adesão a matriz extracelular	<i>ebps</i>	Colonização e disseminação através dos tecidos Artrite séptica, ceratite ocular	(GHASEMIAN et al., 2015)
Proteína de adesão ao fibrinogênio	Codifica a proteína de ligação ao fibrinogênio	<i>fib</i>		

Proteína de adesão à laminina	Codifica a proteína de ligação à laminina	<i>eno</i>		
Proteína de adesão à sialoproteína óssea	Codifica a proteína de ligação à sialoproteína óssea	<i>bbp</i>		
Proteína de adesão ao colágeno	Adesão aos tecidos ricos em colágeno	<i>cna</i>		
Proteína A	Neutraliza imunoglobulinas (anticorpos) Evasão do sistema imune	<i>spa</i>		(DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008)

Abaixo, estão descritos os fatores de virulência que foram estudados no presente estudo.

3.5.1. Coagulase

A coagulase é uma proteína extracelular que se liga à protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina, que permite que converta o fibrinogênio, uma proteína plasmática produzida pelo fígado, em fibrina. Este fato resulta na formação de coágulos de fibrina em volta das bactérias, o que dificulta o seu reconhecimento pelas defesas do hospedeiro, assim como a fagocitose pelas células do sistema imunitário (SANTOS, 2009; COSTA et al., 2011). Esta proteína também é capaz de se ligar ao fragmento Fc das imunoglobulinas G, impedindo a opsonização (GHASEMIAN et al., 2015).

3.5.2. Toxinas com atividade de superantígeno (SAg)

Algumas toxinas sintetizadas por *S. aureus* apresentam atividade de superantígenos, tais como as enterotoxinas, a toxina de Síndrome de Choque Tóxico (TSST-1) e as toxinas esfoliativas (BUKOWSKI; WLADYKA; DUBIN, 2010). Os superantígenos são proteínas capazes de desencadear uma resposta imune excessiva ou descontrolada, na qual corre uma ativação inespecífica das células T, liberando grandes quantidades de citocinas pro-inflamatórias, incluindo fator de

necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas e interferon-gama (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Essa resposta excessiva ocorre quando o sistema imunológico está combatendo patógenos, as citocinas sinalizam células imunológicas, como células T e macrófagos, para irem até local da infecção. Ao mesmo tempo, as citocinas ativam essas células, estimulando-as a produzirem mais citocinas. Normalmente, esse ciclo de *feedback* é normalizado pelo organismo. No entanto, em alguns casos, a reação se torna descontrolada e muitas células imunológicas são ativadas em um único local. Essa reação, possivelmente, é causada por uma resposta exagerada quando o sistema imunológico encontra um invasor novo e altamente patogênico (RÖDSTRÖM, 2014). A superprodução de citocinas tem potencial para causar hipotensão, choque e danos significativos aos tecidos e órgãos do corpo (BENKERROUM, 2018). Os genes que codificam a produção de SAgS podem estar presentes em elementos genéticos móveis, como fagos, ilhas de patogenicidade e plasmídeos (FITZGERALD et al., 2001; RÖDSTRÖM, 2014).

3.5.2.1. Enterotoxinas Estafilococicas (SEs)

As enterotoxinas estão dentro do grupo de enterotoxinas pirogênicas com atividade de superantígenos (PTSAgs), que são proteínas globulares de cadeia única e com tamanho molecular em média de cerca de 25 kDa (BENKERROUM, 2018). Elas atacam as células intestinais, levando à gastroenterite, geralmente provocando diarreia, vômitos, e inflamação intestinal ou gástrica. São estáveis e resistentes ao calor, proteinases digestivas, agentes desnaturantes, irradiação e uma ampla faixa de pH (BENKERROUM, 2018; CHEN; XIE, 2019).

As enterotoxinas que se encontram dentro desse grupo são: as SEs (*Staphylococcal Enterotoxins*) clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), as SEs não clássicas (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET), que têm atividade emética comprovada, e as SEIs – *Staphylococcal enterotoxins like* - (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIV, SEIX, SEIY), que ainda não possuem atividade emética comprovada (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; JUNG HR, LEE YJ, 2022). Essas enterotoxinas compartilham estrutura, função e homologia genética. A patogenicidade resulta da penetração do revestimento intestinal, obtendo acesso aos tecidos, com o qual se produz grande proliferação de células T e liberação de citocinas

pró-inflamatórias (BENKERROUM, 2018; TUFFS; HAERYFAR; MCCORMICK, 2018; KRAKAUER, 2019; PARUSSOLO et al., 2019).

Uma cepa de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de enterotoxina (NORMANNO et al., 2005). Os genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas (SE) estão localizadas no DNA cromossômico e em elementos moveis, incluindo ilhas de patogenicidade, bacteriófagos, transposons e plasmídeos. O locus regulador gene acessório (*agr* – accessory gene regulator) é responsável pela produção das SEs, SEB, SEC e SED, enquanto SEA e SEJ são *agr* independentes (NAWROTEK et al., 2005; ARGUDÍN et al., 2012; TALLENT; BENNETT; HAIT, 2017).

3.5.2.2. Síndrome do Choque Tóxico (TSST)

Outra toxina que faz parte do grupo SAg é a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSS-1), codificada pelo gene *tst* (BUKOWSKI; WLADYKA; DUBIN, 2010). O termo “Síndrome do Choque Tóxico” foi descrito pela primeira vez pelo Dr. Todd, em 1978, em um grupo de crianças com quadro clínico caracterizado por febre alta, vômito, diarreia aquosa, erupção cutânea escarlatiniforme, afecção multisistêmica, entre outros (TODD et al., 1978). Posteriormente, em 1980, ocorreu uma série de casos associados ao uso de absorventes femininos, que eram responsáveis pela colonização vaginal por cepas produtoras de toxinas de *S. aureus* (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; KLOMPAS et al., 2010).

3.5.3. Citotoxinas Hemolíticas

Em *S. aureus*, existem três hemolisinas principais, denominadas alfa (α -hemolisina), beta (β -hemolisina) e delta (δ -hemolisina), que também estão associadas com a patogenicidade da bactéria (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). As hemolisinas beta são codificadas pelo gene (*hlyB*), e têm a capacidade de lisar os eritrócitos e as hemolisinas alfa (*hlyA*) e delta (*hlyD*) atuam danificando as membranas com a formação de poros (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014; MONECKE et al., 2014). Estão presentes na maioria de cepas de *S. aureus*, devido à sua localização estável em uma parte do cromossomo e são reguladas positivamente pelo locus *agr* (KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

A Alfa-hemolisina (alfa-toxina) é uma proteína citolítica com atividade neurótoxica e necrótica, que tem a capacidade de formar poros nas membranas das células como, eritrócitos, linfócitos T, macrófagos, células mononucleares, endoteliais, epiteliais e plaquetas, causando alteração na permeabilidade da membrana, desequilíbrio osmótico, extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da célula (DA SILVA et al., 2012).

A Beta-hemolisina (beta-toxina) é uma proteína com afinidade por membranas plasmáticas, e degrada a esfingomielina na camada fosfolipídica externa da membrana de eritrócitos, leucócitos, neurônios, entre outros, produzindo instabilidade na membrana, e torna a célula susceptível a vários fatores, como mudança de pH, variação de temperatura e carga iônica (ACOSTA et al., 2018).

A Delta-hemolisina (delta-toxina) é uma toxina peptídica hemolítica estável ao calor, capaz de causar o vazamento do citoplasma e posterior lise de vários tipos de membranas de células de mamíferos, além de eritrócitos, organelas com envoltório celular e protoplastos bacterianos (NAKAMURA et al., 2013). Porém, sua função no processo infeccioso ainda não está clara (NAKAMURA et al., 2013). No entanto, vários trabalhos mostram que contribui na dermatite atópica como potente indutor a degranulação de mastócitos (NAKAMURA et al., 2013; OTTO, 2014; ACOSTA et al., 2018).

3.5.4. Proteína A

A proteína A, é uma proteína de parede celular de 40 a 60 kDa codificada pelo gene *spa* (*Staphylococcus protein A*), que possui uma região polimórfica X, que é geralmente formada por repetições de 24 pares de base, mas pode apresentar variações de 21 a 30 pares de base (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). Esta proteína é ancorada ao envelope da parede celular bacteriana e é secretada durante a fase de crescimento exponencial (BECKER et al., 2014). A diversidade nas repetições da região X entre as cepas pode estar relacionada à mutações, provocando deleções ou duplicações nas unidade repetidas (KOREEN et al., 2004; FALUGI; KIM; MISSIAKAS, 2013). A proteína é composta por cinco domínios de ligação de Ig homólogos, cada domínio é capaz de se ligar a proteínas, mais notavelmente à IgGs,

nas regiões Fc e Fab. A interação de SpA com IgM Fab desencadeia a depleção de células B, suprimindo o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas (FALUGI; KIM; MISSIAKAS, 2013). Assim, a infecção por bactérias que expressam SpA não oferece proteção contra a infecção subsequente por *S. aureus*, inibindo a morte fagocitária do microrganismo (O'HALLORAN; WYNNE; GEOGHEGAN, 2015). Este processo é provavelmente dependente da interação de SpA com IgG Fc (FALUGI; KIM; MISSIAKAS, 2013; BECKER et al., 2014).

3.5.5. Componentes da Superfície Microbiana que reconhecem as Moléculas Adesivas da Matriz Celular (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules - MSCRAMMs)

São componentes proteicos presentes na superfície microbiana e medeiam a adesão aos componentes da matriz extracelular de células e tecidos do hospedeiro, como fibronectina (fn), colágeno (cn) e fibrinogênio (fg). Além disso, intervêm na evasão de respostas imunes à formação de biofilme. Os genes que codificam para MSCRAMMs se classificam em *fnbpA* e *fnbpB*, que se ligam a fn; *clfA*, *clfB*, e *sdrG*, que se ligam a Fg; *fib* que codifica a proteína de ligação ao fg; *eno* que codifica a proteína de ligação à laminina; *cna* que codifica a proteína de ligação ao colágeno; *ebps* que codifica a proteína de ligação à elastina; e *bbp* que codifica a proteína de ligação à sialoproteína óssea (VAZQUEZ et al., 2011; GHASEMIAN et al., 2015; THOMPSON; BROWN, 2017).

A pesquisa de todos estes genes que codificam fatores de virulência em *S. aureus* é importante para se conhecer os mecanismos empregados por esta bactéria para se manter no ambiente de produção de queijos, incluindo inferências sobre a capacidade de provocarem mastite, além de fornecer informações quanto ao seu potencial patogênico para os seres humanos.

3.5.6. Biofilme

A formação de biofilme contribui para a sobrevivência e disseminação do microrganismo. Os biofilmes microbianos são comunidades multicelulares que podem se aderir e desenvolver em superfícies bióticas ou abióticas (CARVALHO et al., 2021).

Estas comunidades são envolvidas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas produzidas pelos próprios microrganismos para aumentar a sua capacidade de sobrevivência em diversos ambientes. A formação de biofilme ocorre nas seguintes etapas: fixação de células na superfície ou adesão primária; adesão irreversível, crescimento e produção de matriz exopolissacarídica (EPS), formação de estruturas com forma de cogumelos; maturação do biofilme; desprendimento e dispersão de material celular permitindo a colonização de outros sítios (GIAOURIS et al., 2014; ACOSTA et al., 2018; MIAO et al., 2019; QIAN et al., 2019).

A produção de biofilme deve-se a presença do operon *ica* (cluster de adesão intracelular), constituído pelos genes *icaA*, *icaD* (SHARMA et al., 2017). Estes codificam proteínas envolvidas na síntese de adesina extracelular que inicialmente permite a adesão entre as bactérias por meio do polissacarídeo (PIA) a uma superfície, e posteriormente, se multiplicam e formam uma multicamada de biofilme que está associada a produção de polissacarídeo e adesina (SHARMA et al., 2017). O gene *icaA* codifica uma enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina, e o gene *icaD* influencia na expressão de *icaA*, levando à expressão do polissacarídeo capsular que está envolvido na ligação entre as células bacterianas (O'NEILL et al., 2007; TORRES et al., 2019). Dentre as proteínas, a Bap foi associada a formação de biofilme em cepas de *S. aureus*, na etapa de adesão às superfícies bióticas e abióticas (TORRES et al., 2019). A susceptibilidade reduzida aos antibióticos em *S. aureus* foi associada à formação de biofilme e atribuída à redução tanto da difusão dos antibióticos através da matriz de biofilme, como da atividade metabólica da bactéria dentro dessa matriz (O'NEILL et al., 2007).

O estudo de biofilmes microbianos na indústria de alimentos é de grande importância porque a formação de biofilme nos locais de processamento de alimentos é uma fonte de contaminação que pode contribuir com a deterioração dos alimentos e que representa um perigo na qualidade e segurança dos produtos (GIAOURIS et al., 2014; THIRAN et al., 2018).

3.6. Resistência a Antibióticos

O uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de infecções tem provocado o aumento da propagação de cepas resistentes aos antimicrobianos, particularmente *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), sendo identificados como grandes reservatórios, humanos, animais e alimentos que podem representar um grave problema para os sistemas de atenção à saúde (VAN LOO et al., 2007; TÜRKYILMAZ et al., 2010; DIAS et al., 2011; NAM et al., 2011; TAVAKOL et al., 2012; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2013). Esse microrganismo encontra-se na lista de agentes patogênicos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS), dividida em três categorias, de acordo com a urgência em que se necessitam novos antibióticos: prioridade crítica, alta ou média. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina se classifica como prioridade alta (OMS, 2017). As cepas de *S. aureus* resistentes a metilina são denominadas MRSA, e possuem o gene *mecA* ou uma concentração inibitória mínima (MIC) à oxacilina >4 mg/L (HOSOSAKA et al., 2007). A resistência ocorre pela alteração da proteína de ligação à penicilina (PBP2a), que impede a afinidade do antibiótico pelo local de ligação na parede celular da bactéria (CERQUEIRA; ALMEIDA, 2013).

3.7. Caracterização de *Staphylococcus aureus* por Técnicas de Tipagem Molecular

As técnicas de tipagem contribuem na relação entre isolados de uma mesma espécie, comparando microrganismos envolvidos em surtos, assim como reconhecer variantes associadas a diversos ambientes e espécies animais (AL-OBAIDI; SUHAILI; DESA, 2018). Entre as técnicas de tipagem de *S. aureus* mais comuns temos: *agr typing*, *spa typing* e *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (HARMSSEN et al., 2003; MCDOUGAL et al., 2003; TAVAKOL et al., 2012; VIVAS; GUTIERREZ, 2019).

3.7.1. Locus *agr*

O locus *agr* codifica um sistema de regulação de dois componentes, que é ativado em alta densidade celular pelo mecanismo de *quorum sensing* (LIMA et al.,

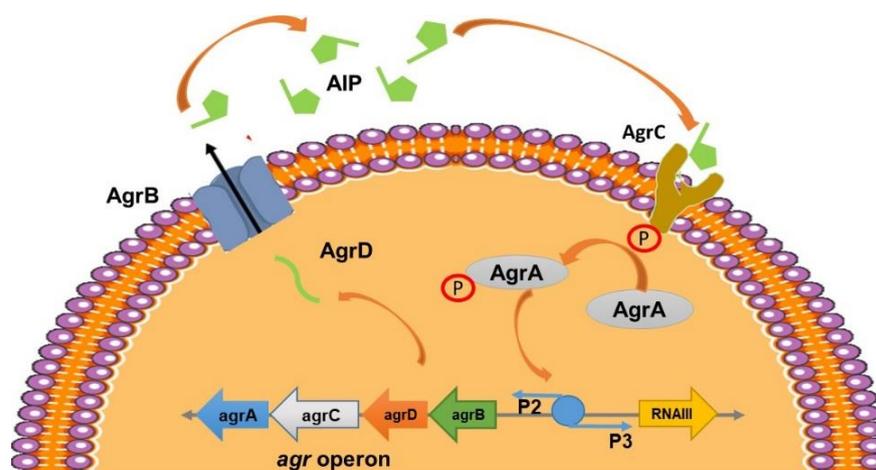
2020). Esse sistema é responsável pela produção de grande parte dos fatores de virulência e da patogenicidade de *S. aureus*, incluindo uma variedade de proteínas de superfície envolvidas na colonização e disseminação tecidual, assim como toxinas extracelulares envolvidas na invasão (CANOVAS et al., 2016).

O locus *agr* é composto por dois operons expressos a partir de promotores de P2 e P3 (Figura 2). O operon expresso pelo promotor P2 compreende quatro genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, que codificam proteínas que cumprem várias funções. As proteínas AgrD e AgrB estão envolvidas na codificação, modificação e secreção do peptídeo auto indutor (AIP – Auto Inducer Peptide). A proteína AgrC é um sensor de membrana, receptor do sinal AIP e a proteína AgrA é um regulador de resposta que quando fosforilado ativa transcrição dos promotores P2 e P3. O produto do promotor P3 regula fatores de virulência extracelulares (QUAVE, 2014).

Em resumo, o AIP é derivado do propeptídeo AgrD e processado pela ação de AgrB. O AIP extracelular interage com AgrC na membrana para ativar AgrA, regulando positivamente a transcrição dos promotores P2 e P3. Em altas densidades celulares, o acúmulo de AIP induz a expressão de exoproteínas, α -hemolisina, lipases, enterotoxinas, leucocidinas e na regulação negativa de proteínas associadas à superfície como a proteína A codificada pelo gene *spa*, adesinas e coagulase (QUAVE, 2014; CANOVAS et al., 2016; TAN et al., 2018).

Segundo o tipo de locus *agr*, *S. aureus* pode ser classificado em quatro grupos: *agr-I*, *agr-II*, *agr-III*, *agr-IV*. Vários estudos indicam que, possivelmente, o locus *agr* facilita a colonização do hospedeiro, podendo inibir o crescimento de microrganismos semelhantes. Um bom exemplo é o caso do sistema *agr-IV* que inibe o crescimento de *S. epidermidis* para benefício de *S. aureus* (TRABER et al., 2008; THOMPSON; BROWN, 2017). Além disso, estudos destes grupos revelam que o AIP de cepas pertencentes ao mesmo grupo ativa respostas entre si, e cepas pertencentes a grupos distintos competem por níveis de expressão de genes de virulência (DUFOUR et al., 2002; SHOPSIN et al., 2003).

Figura 2 - Mapa funcional do sistema regulador gênico acessório (*agr*) em *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Adaptado de Quave, 2014

AgrB contribui na translocação e modificação de AgrD; *agrD* codifica o peptídeo autoindutor (AIP); *agrC* codifica uma proteína de membrana histidina quinase, receptora do sinal AIP; *agrA* codifica um regulador de resposta que é o AgrA, que, após fosforilação ativa a transcrição dos promotores alvo.

3.7.2. Tipagem por *spa typing*

A técnica *spa typing* é baseada na amplificação e sequenciamento de DNA do locus único da região polimórfica X, que pertence a uma parte conservada do genoma do microrganismo. O gene *spa* codifica a proteína de membrana do *Staphylococcus aureus* (*spa*). Este gene é formado por repetições que podem sofrer alterações como adições, deleções ou mutações. É por isso que na análise dos dados sequenciados, cada repetição recebe um código numérico e o tipo de *spa* é deduzido da ordem de repetições específicas (BHATI et al., 2016; ASADOLLAHI et al., 2018; HASHEMIZADEH et al., 2019).

Essa técnica fornece um método rápido e preciso para discriminar *S. aureus* isolados de surtos e alimentos, sendo possível relacioná-los do ponto de vista evolutivo e epidemiológico como, por exemplo, a distribuição dos tipos *spa* e a frequência deles no país (KORSEN et al., 2004).

3.7.3. Tipagem por Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE)

A PFGE é uma técnica considerada como "padrão ouro". No entanto, o sequenciamento do genoma completo (Whole Genome Shotgun - WGS) está ocupando o lugar da PFGE (RIBOT et al., 2019). É uma técnica baseada na análise do DNA cromossômico total, seguido por digestão com enzimas de restrição (VIVAS; GUTIERREZ, 2019). Os produtos de digestão são analisados em um gel de agarose, aplicando um campo elétrico que muda periodicamente de direção, permitindo a separação de fragmentos grandes de DNA de até 10 Mb (HE; XIE; REED, 2014). Posteriormente, o gel é corado com Brometo de Etídeo e a revelação do gel é realizada por meio de um transiluminador ultravioleta. Os padrões de bandas obtidos podem ser comparados visualmente com a ajuda de um *software* (TENOVER et al., 1995; MCDOUGAL et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos isolados bacterianos e isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo

A coleta de isolados para este estudo foi realizada em dois estudos prévios divididos em: longitudinal e transversal, identificados previamente em placas 3M™ Petrifilm™ por Campos et al. 2021. Para o estudo transversal, foram utilizados isolados *Staphylococcus* coagulase positivo de Queijos Minas Artesanais da Canastra com maturação mínima de 22 dias, visto que até então era esse o período exigido por legislação. Já para o estudo longitudinal foram utilizados isolados *Staphylococcus* coagulase positivo de leite cru, cultura endógena "pingo", e queijos em diferentes tempos durante a maturação. Essas amostras foram analisadas previamente no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) no trabalho de mestrado de Campos, 2019. Posteriormente à detecção, foram isoladas de 5 a 7 colônias de cada amostra analisada e os isolados foram armazenados em caldo Brain Heart Infusion (BHI; OXOID, England)) acrescidos de glicerol 20%, e congelados a -80°C.

Para o estudo transversal, foram analisados 248 isolados provenientes de queijos de 83 propriedades produtoras da Serra da Canastra (MG), nos municípios de Medeiros, São Roque de Minas e Tapiraí. Já para o estudo longitudinal, foram analisados 197 isolados a partir de queijos durante a maturação, provenientes de três propriedades produtoras de queijos localizadas no município de São Roque. Para a identificação, os isolados foram semeados em placas contendo ágar Baird Parker (BP; BD, EUA) (DA SILVA et al., 2017). Além disso, foram realizados testes bioquímicos convencionais, tais como fermentação de glicose e manitol, catalase, coagulase em tubo, teste da termonuclease, observação da morfologia microscópica por meio da técnica de Gram, e aglutinação em látex (FERREIRA et al., 2016). Posteriormente, a identidade do microrganismo foi confirmada mediante PCR convencional, pela amplificação do gene *nuc*, conforme descrito a seguir.

4.2. Origem das cepas controle

As cepas controle utilizadas no presente estudo foram doadas pela professora doutora Nathalia Cristina Cirone Silva da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e pelo professor doutor Natan de Jesus Pimentel - Filho da Universidade Federal de São Carlos, Campus Lagoa do Sino, como portadoras dos genes mencionados no Anexo 1.

4.3. Identificação de *S. aureus* por PCR convencional

4.3.1. Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA dos isolados foi realizada segundo o protocolo de Monteiro (2014), com modificações. Foram coletados 2 mL de cultura *overnight* em caldo BHI, e o *pellet* obtido por centrifugação a 12.000 rpm a 27°C durante 3 min. Para as lavagens, o sedimento foi homogeneizado em 500 µL de tampão TE 10:1, e centrifugado a 12.000 rpm durante 2 min. As lavagens foram repetidas 3 vezes. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de TE e a suspensão foi incubada a 80°C por 10 min. Após a centrifugação a 8.000 rpm durante 1 min, o sobrenadante foi armazenado e mantido a -20°C. A quantidade e qualidade do DNA extraído foi avaliada no Espectrofotômetro Implen NanoPhotometer N50.

4.3.2. Amplificação por PCR

As técnicas de PCR convencional e eletroforese em gel de agarose foram utilizadas para identificação do microrganismo *S. aureus*, detecção de genes de virulência e resistência a antibióticos e em técnicas de tipagem molecular.

Os termocicladores utilizados para o desenvolvimento da técnica foram: Veriti™ 96-Well Thermal Cycler Applied Biosystems, Thermofisher e Mastercycler® nexus gradiente, Eppendorf. A reação de amplificação dos genes de interesse de *S. aureus* foi realizada contendo 1 µL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10 pmol), 12,5 µL de master mix GoTaq® Green (M7122; Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL de DNA (20 ng µL⁻¹) e 9,5 µL de água livre de nuclease para um volume máximo de reação de 25 µL. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em

gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão TBE 0,5X por 35 minutos a 100 V, e foi aplicado um padrão de peso molecular de 100 pb ou 1kb (Invitrogen, Carlsbad. EUA) dependendo do caso. Os géis foram corados com SYBR® Safe (Invitrogen, Carlsbad. EUA) e posteriormente visualizados e fotografados sob luz UV no transiluminador ImagerGelDoc XR (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, EUA) capturados com o software ImageLab TM (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, EUA), para analisar o tamanho dos fragmentos.

4.3.3. Caracterização molecular dos isolados por PCR convencional

4.3.3.1. Confirmação da identidade de *Staphylococcus aureus*

Uma vez feita a extração do DNA, a confirmação da identidade dos microrganismos foi realizada mediante detecção do gene *nuc* por PCR (Tabela 1).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para o gene *nuc*.

Oligonucleotideo (Sequência 5'→3')	pb	Condições da reação	Referência
Nuc		94°C/4 min	
F: GCGATTGATGGTGATACGGTT	280	94°C/1 min	(IGBINOS A et al., 2016)
R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		55°C/1min	
		72°C/1min	
		72°C/10min	

4.3.3.2. Tipagem molecular

4.3.3.2.1. Tipagem do locus *agr*

O locus *agr* em *S. aureus* possui quatro grupos (I, II, III e IV) que foram detectados por amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores mostrados na Tabela 2.

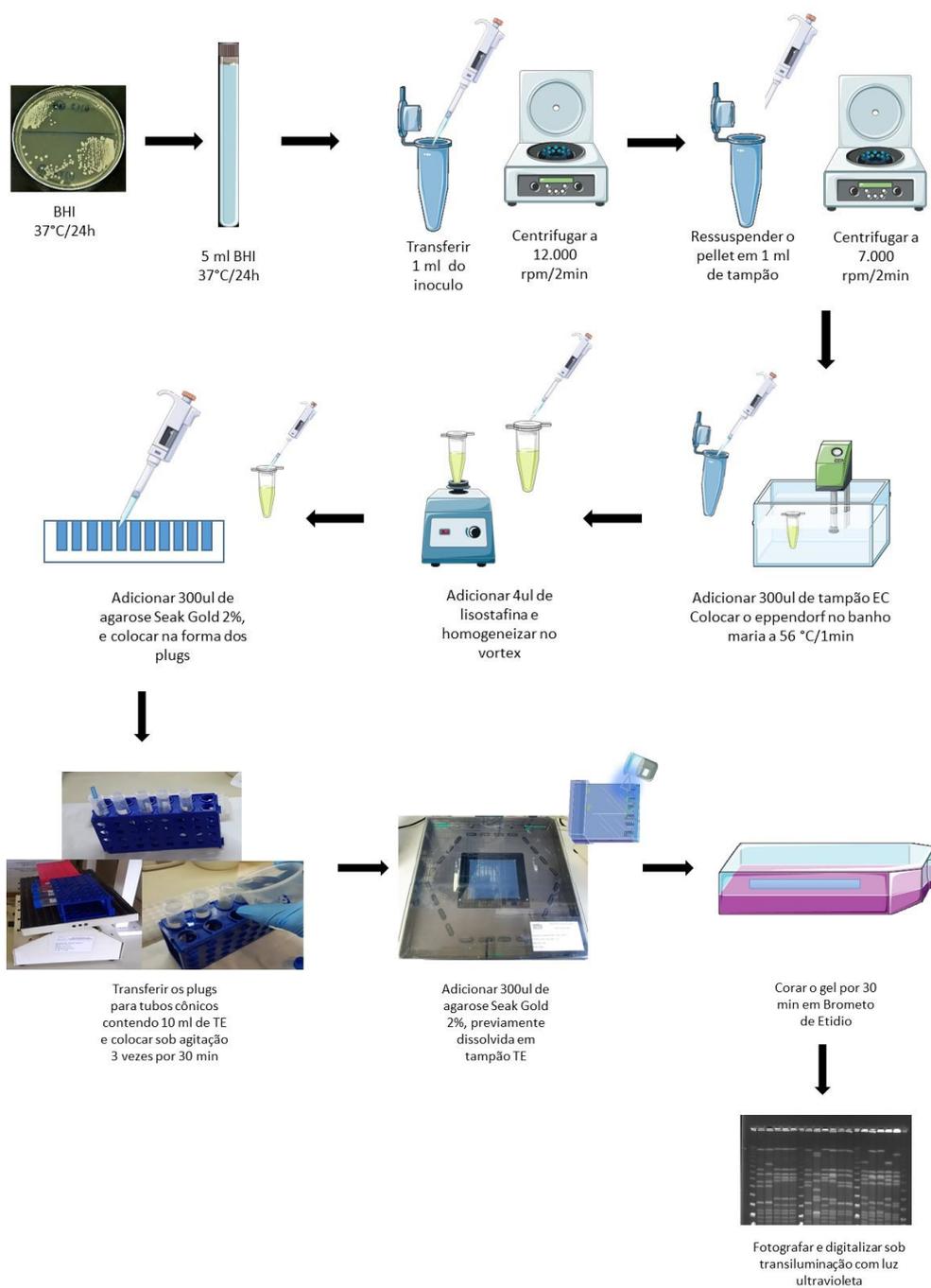
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para tipagem do locus *agr*.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Condições da reação	Referência
agrI GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT pan-agr ATGCACATGGTGACATGC	440		
agrII GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC pan-agr ATGCACATGGTGACATGC	572	94 °C/1 min 95 °C/15 seg 55 °C/30 seg 72 °C/2 min 72 °C/7 min	(SHOPSIN et al., 2003)
agrIII CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC pan-agr ATGCACATGGTGACATGC	406	} 30 ciclos	
agrIV CGATAATGCCGTAATACCCG pan-agr ATGCACATGGTGACATGC	588		

4.3.3.2.2. Tipagem por eletroforeses de campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – SP), de acordo com protocolo descrito por Bannerman et al. (1995) utilizando-se a enzima SmaI para clivar o DNA cromossomal, como descrito a seguir (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da técnica PFGE



Fonte: Autor

4.3.3.2.2.1. Extração do DNA genômico para PFGE

Os isolados de *S. aureus* foram semeados em ágar BHI, e incubados a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, as colônias da placa foram repicadas em caldo BHI, e incubadas *overnight*. Após esse período, 1 ml do inoculo foi transferido a um tubo

cônico tipo *ependorf* e centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão TE e centrifugado a 7000 rpm, por 2 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi resuspendido em 300 µl de tampão EC. O tubo com essa suspensão foi colocado em banho maria a 37°C, durante 1 minuto. Posteriormente, foi adicionado 4 µl de uma solução de lisostafina a 1 mg/ml dissolvida em 20 mM de acetato de sódio em pH 4,5 e 300 µl de agarose Seakem Gold (Sigma, USA) a 2% dissolvida em tampão TE. Essa solução foi homogeneizada por pipetagem e transferida para os moldes dos *plugs* onde permaneceu a temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para a solidificação dos *plugs*. Foram feitos de 2 a 3 *plugs* por isolado. Após essa etapa, os *plugs* foram transferidos para tubos cônicos de 15ml, contendo 1ml de tampão EC a 37°C por um período de 1 hora, sem agitação. Após isso, foi descartada a solução, adicionados 3 ml de tampão TE esterilizado e incubados a 55°C por uma 1 hora, sem agitação. Logo depois, a lavagem dos *plugs* foi realizada 3 vezes com a adição de 10ml de tampão TE, e deixado sob agitação durante 30 minutos. Por último, foi descartada a solução dos *plugs* e substituída por 3ml de tampão TE, para ser armazenados a 4°C até serem submetidos a digestão.

4.3.3.2.2.2. Digestão enzimática

A digestão enzimática foi realizada com a adição de uma fatia do *plug* a 45µl de tampão 1X em um tubo de *ependorf*. Foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, foi retirado todo o tampão, e foram adicionados 45µl de tampão 1X para enzima com 20U de enzima Smal (20U/45µl=0,4U/µl). Posteriormente, os *plugs* com a enzima foram mantidos a 25°C por no mínimo 4 horas. O DNA digerido foi armazenado a 4°C até o momento da corrida.

4.3.3.2.2.3. Preparo do gel de agarose

A preparação do gel foi feita com agarose Seakem Gold a 1% em 100ml de tampão TBE 0,5X pH 8,0. Para preparar o pente, foram transferidos os *plugs* para o pente, colocando-os lado a lado e tirando o excesso do tampão. Em seguida, o pente foi encaixado no molde e os *plugs* alinhados na base e, então, a agarose foi despejada no molde cuidadosamente e deixada para esfriar por, aproximadamente, 30 minutos.

Posteriormente, o pente do molde foi retirado e o excesso de agarose foi removido e colocado na cuba dentro da moldura preta. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o Lambda DNA ladder (New England Biolabs, Inc., USA) de 48,5KB até 1,0Mb.

4.3.3.2.2.4. Preparo do tampão de corrida e da cuba de eletroforese

Foram preparados 2L de tampão TBE 0.5X pH 8.0 a partir do TBE estoque 10X pH 8.0, diluindo 100ml de TBE 10X Invitrogen™ UltraPure™ (1 M Tris, 0,9 M de ácido bórico e 0,01 M de EDTA) e completado até 2L, em balão volumétrico, com água destilada estéril. Foi despejado o tampão pronto na cuba, cobrindo completamente o gel.

4.3.3.2.2.5. Parâmetros de corrida

O equipamento utilizado foi o CHEF-Dr III System (BIO-RAD, USA). Primeiramente, foram ligados o equipamento, o sistema de refrigeração, e a bomba de vácuo (velocidade 70). Em seguida, foi ajustada a temperatura à 14°C. O ajuste da fonte foi realizado com um tempo inicial de 5 segundos, tempo final de 40 segundos, tempo de corrida de 20 horas, e tensão de 200 volts. Uma vez terminada a corrida o equipamento foi desligado e o gel foi corado por 30 minutos em água destilada com Brometo de Etídio 10mg/ml (Sigma, USA). Após esse tempo, o gel foi descorado em água destilada até obter boa nitidez. Logo após a finalização da corrida, o gel foi fotografado e digitalizado sob transiluminação com luz ultravioleta.

4.3.3.2.2.6. Identificação dos genótipos PFGE

Os géis foram fotografados e digitalizados através do equipamento DNR Bio-Imagem Systems mini (Bis Pro) e salvos como um arquivo TIFF para análise com o *software* BioNumerics (versão 7.6; AppliedMaths, Ghent, Belgium) para gerar o dendograma com os agrupamentos entre as amostras. Foi utilizada uma tolerância de 1,5%, uma otimização de 0,5% e um cociente de similaridade de 80%. Os perfis de bandas obtidos foram avaliados aplicando-se o coeficiente de Dice e o método de pareamento de bandas (UPGMA) (TENOVER et al., 1995; MCDUGAL et al., 2003).

4.3.3.2.3. Tipagem por *spa typing*

Para a tipagem por *spa typing*, foi realizada a amplificação por PCR do fragmento variável da região polimórfica do gene *spa* que encontra-se na Tabela 3 (KHAIRALLA; WASFI; ASHOUR, 2017) (www.ridom.de, 2015), seguida de purificação do produto. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. O sequenciamento do produto obtido e análise dos resultados foram realizados de acordo com as recomendações da base de dados StaphType (<https://spa.ridom.de/index.shtml>).

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições da reação para tipagem da região *spa*.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Condições da reação	Referência
spa F: TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC R: CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	Variável	80 °C/5 minutos 94 °C/45 segundos 60 °C/45 segundos 72 °C/ 90 segundos 72 °C/10 minutos	(KHAIRALLA; WASFI; ASHOUR, 2017)

4.3.4. Pesquisa de fatores de virulência

Foram pesquisados os genes de virulência que codificam a produção de hemolisinas (HLA e HLB), TSST-1, enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEO), os que codificam a formação de biofilme (*icaA*, *icaD*, *bap*), componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMM) (*clfA*, *clfB*, *fnbB*, *eno*, *fib*, *bbp*) e componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz celular (MSCRAMM) (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *cna*, *eno*, *ebpS*, *bbp*). Todos os primers que foram utilizados neste estudo estão listados nas Tabelas 4,5,6 e foram baseados nos trabalhos de VASUDEVAN et al., 2003; GHASEMIAN et al., 2015; FERREIRA et al., 2016.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes de virulência dos isolados de *S. aureus*.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Condição da reação	Referência	
tst F:TTCACTATTTGTA AAAAGTGTCAGACCCACT R:TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	180	94°C/15 min 94°C/2 min 57°C/2 min 72°C/1 min 72°C/7 min 95 °C/5 min	35 ciclos	
sea F:GAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R:CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTT	560	95°C/1 min 53°C/1 min 72°C/45 seg 72°C/5 min		40 ciclos
seb F:ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA R:ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	95 °C/15 min 95°C/1 min 63°C/1 min 72°C/1 min 72°C/5 min	40 ciclos	
sec F:GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG R:CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	297	95 °C/15 min 95°C/45 seg 54°C/1 min 72°C/30 seg 72°C/5 min	35 ciclos	
sed F:GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R:GCTGTATTTTTCTCCGCTAAATAATATG	492	95 °C/ 5 min 95°C/ 1 min 56°C/ 1 min 72°C/ 1 min 72°C/ 5 min	40 ciclos	
see F:CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC R:CACCTTACCGCCAAAGCTG	482			
seg F:AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC R: AAACCTTATATGGAACSSSSGGTACTAGTTC	642	95°C/15 min 95°C/30 seg 56°C/30 seg 72°C/50 seg 72°C/10 min	35 ciclos	(FERREIRA et al., 2016) com modificações nas temperaturas de reação
sei F: CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG R: AAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	576	95°C/5 min 95°C/45 seg 56°C/1 min 72°C/45 seg 72°C/5 min	40 ciclos	
sej F: TAACCTCAGACATATATACTTCTTAACG R: AGTATCATAAAGTTGATTGTTTTCATGCAG	300	95°C/5 min 95°C/1 min 54°C/1 min 72°C/1 min 72°C/5 min	40 ciclos	
sem F: CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAC R: TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	326	95°C/15 min 95°C/30 seg 56°C/30 seg	35 ciclos	
seo F: AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA R: ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC	180	72°C/50 seg 72°C/10 min		

seh	376		
F: CAATCACATCATATGCGAAAGCAG			
R: CATCTACCCAAACATTAGCACC		95°C/5 min	
hla		95°C/1 min	
F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	55°C/1 min	} 40 ciclos
R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		72°C/1 min	
hlb		72°C/5 min	
F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309		
R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT			

TSST-1 = toxina associada a síndrome do Choque Tóxico; HLA= alfa-hemolisina; HLB= beta-hemolisina; SEA-SEE, SEG-SEJ, SE-SEO enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I, J, M, N, O; LukE-LukD= Leucocidinas E-D. F= forward; R= reverse. Identificação de genes que codificam a formação de biofilme

Os oligonucleotídeos utilizados para a identificação de genes de formação de biofilme estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Genes envolvidos na formação de biofilme e seus respectivos oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Temperatura de anelamento °C	Condições da reação	Referência
icaA F: CCTAACTAACGAAAGGTAG R: AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	49	94°C/4 min 94°C/60 seg anel/°C 40 ciclos 72°C/60 seg 72°C/10 min	(VASUDEV AN et al., 2003; DARWISH; ASFOUR, 2013)
icaD F: AAACGTAAGAGAGGTGG R: GGCAATATGATCAAGATAC	381	49		
bap F: CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG R: GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	60		

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes que codificam MSCRAMMs estão identificados na Tabela 6.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos de genes que codificam MSCRAMMs.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Condições da reação	Referência
clfA F: ATGGCGTGGCTTCAGTGCT R: CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	288		
clfB F: ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC R: TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	204		
fnbA F: CATAAATTGGGAGCAGCATCA R: ATCAGCAGCTGAATTCCCATT	128		
fnbB F: GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT R: CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524		(GHASEMI AN et al., 2015)
fib F: CTACAACTACAATTGCGTCAACAG R: GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	405	94°C/5min 94°C/1min 55°C/1min ciclos } 25 72°C/1min 72°C/10 min	(TRISTAN et al., 2003)
cna F: AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA R: AGTGCCTTCCCAAACCTTTT	192		
eno F: ACGTGCAGCAGCTGACT R: CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	301		
ebps F: CATCCAGAACCAATCGAAGAC R: AGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	188		

bbp	574
F:AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	
R:ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT-3	

4.3.5. Pesquisa do gene codificador de resistência a meticilina.

O gene pesquisado para identificação de isolados Resistentes a Meticilina (MRSA) foi o *mecA*. A Tabela 7 mostra os primers utilizados para amplificação de *mecA*.

Tabela 7 - Detecção de isolados de MRSA.

Oligonucleotídeo (Sequência 5'→3')	pb	Condições da reação	Referência
mecA		94°C/5min	(GÓMEZ-
F:GGGATCATAGCGTCATTATTC	527	94°C/30seg	SANZ et al., 2010a)
R: AACGATTGTGACACGATAGCC		55°C/30seg	
		72°C/30seg	
		72°C/2 min	

4.4. Caracterização fenotípica dos isolados de *Staphylococcus aureus*

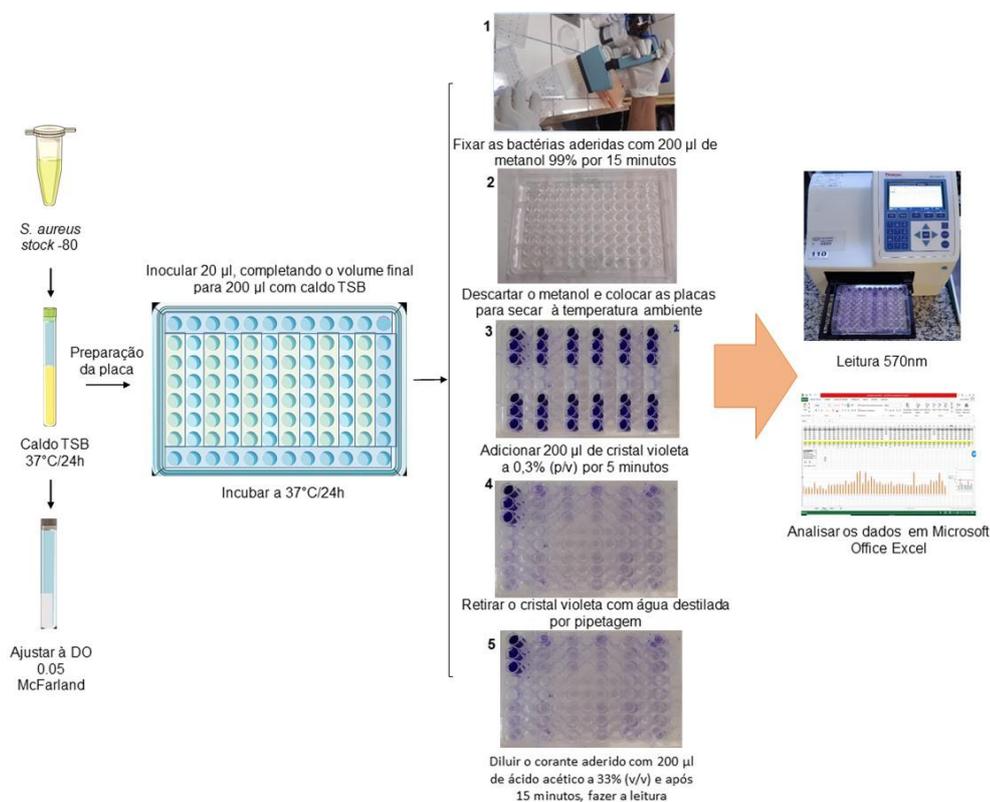
4.4.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados por meio do ensaio de cristal violeta

A avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados de *S. aureus* foi realizada segundo o descrito por Stepanovic et al. (2000), com modificações. Previamente, os poços laterais das placas foram preenchidos com água estéril para evitar a evaporação do conteúdo dos poços do teste. As culturas das bactérias crescidas por 24 horas em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB, KASVI, ITÁLIA) foram ajustadas a uma densidade óptica (DO) de 0.05 McFarland. Em poços de placas de poliestireno de 96 poços, foram inoculadas alíquotas de 20 µl, completando o volume final para 200 µl com caldo TSB. Os microrganismos foram incubados a 37°C, sem agitação. Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados 3 vezes com 300 µl de *Phosphate buffered saline* (PBS, Sigma-Aldrich, EUA), em ambos os casos por pipetagem. As bactérias aderidas à superfície dos poços foram fixadas com 200 µl de metanol 99% por 15 minutos, então o volume de metanol foi descartado e as placas foram colocadas para secar à temperatura

ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 μl de uma solução de cristal violeta a 0,3% (p/v) em cada poço em temperatura ambiente por 5 minutos. O excesso de cristal violeta foi retirado com água destilada por pipetagem e a placa foi seca à temperatura ambiente. O corante aderido ao biofilme foi diluído com 200 μl de ácido acético a 33% (v/v) e a placa foi lida após 15 minutos, para solubilização do mesmo. A densidade óptica de cada poço foi medida a 570 nm usando o leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, EUA). O ensaio foi realizado com duas repetições, em triplicata. Os dados foram então analisados em Microsoft Office Excel (Figura 4).

A formação de biofilme foi classificada como descrito por Stepanovic et al. (2000) sendo a DO “cut-off” (DO_c) definida como a DO do controle negativo somada à três vezes o desvio padrão do controle negativo. A formação de biofilme pelos isolados foi então determinada seguindo o critério: $DO \leq DO_c$ Não formador; $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$ Fracamente formador; $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$ Moderadamente formador; e $4 \times DO_c < DO$ Fortemente formadora.

Figura 4 - Esquema do teste para avaliar a formação de biofilme



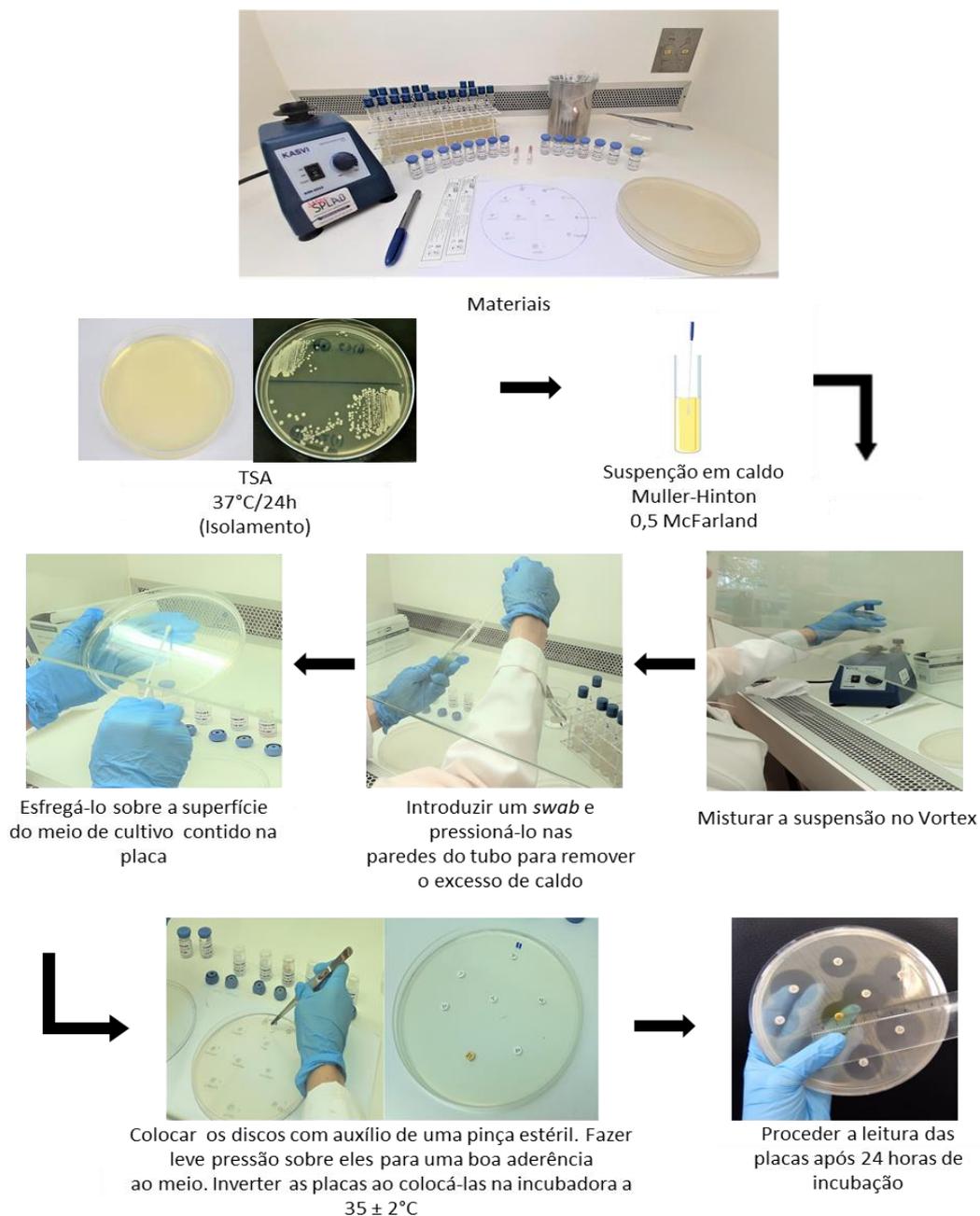
4.4.2. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos

A avaliação da sensibilidade a antimicrobianos do microrganismo pesquisado foi feita pelo Método de Difusão de Disco Sensifar e Multifar-CEFAR®, e a resistência aos antibióticos foi determinada segundo os critérios do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2019) (Tabela 8).

Todos os isolados foram submetidos aos antimicrobianos: cloranfenicol (30 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), estreptomicina (10 mg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg) (VAN LOO et al., 2007; TÜRKYLMAZ et al., 2010; JAMALI et al., 2015; KHORAMROOZ et al., 2017).

A técnica de disco de difusão foi realizada a partir de um cultivo bacteriano em placas de ágar TSA, incubadas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, foi preparada uma suspensão em caldo Muller-Hinton (KASVY, ITÁLIA) em uma concentração de 0,5 McFarland. Em seguida, as suspensões foram semeadas com ajuda de cotonetes estéreis sobre placas de Agar Muller-Hinton e, após isso, discos de antibióticos foram colocados sobre a superfície. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação, os diâmetros das zonas de inibição por difusão de disco foram interpretados segundo O Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI, 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo do teste de sensibilidade a antimicrobianos por discos de difusão



Fonte: Autor

Tabela 8 - Parâmetros CLSI 2019 para interpretação de halos de inibição para *S. aureus*.

Agentes antimicrobianos	Conteúdo do disco (ug)	Diâmetro do Halo de inibição (mm)		
		Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Eritromicina (ERI)	15	≤13	14-17	≥18
Tetraciclina (TET)	30	≤14	15-18	≥19
Cefoxitina (CFO)	30	≤21	-	≥22
Penicilina (PEN)	10 unidades	≤28	-	≥29
Clindamicina (CLI)	2	≤14	15-20	≥21
Vancomicina (VAN)	30	-	-	-
Rinfamicina (RIF)	5	≤16	17-19	≥20
Cloranfenicol (CLO)	30	≤12	13-17	≥18
Gentamicina (GEN)	10	≤12	13-14	≥15
Oxacilina (OXA)	1	≤10	11-12	≥13
Tobramicina (TOB)	10	≤12	13-14	≥15
Cotrimazol (SUT)	25	≤10	11-15	≥16
Azitromicina (AZI)	15	≤13	14-17	≥18
Nitrofurantoina (NIT)	300	≤14	15-16	≥17
Linenzolina (LNZ)	30	≤20	-	≥21
Trimetropin (TRI)	5	≤10	11-15	≥16
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16-20	≥21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Um total de 248 isolados do estudo transversal e 197 isolados do estudo longitudinal, identificados previamente em placas 3M™ Petrifilm™ por Campos (2019) de queijos artesanais da Canastra, foram avaliados mediante os testes bioquímicos: coloração de Gram, coagulase em tubo, coagulase em lâmina, catalase e termonuclease. Além disso, para a confirmação da espécie, foi amplificado por PCR o gene *nuc*, específico para *S. aureus* (IGBINOSA et al., 2016), e para a identificação de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), foi pesquisada a presença do gene *mecA* (GÓMEZ-SANZ et al., 2010b). Após todos os testes para identificação de *S. aureus*, 144 de 248 isolados do estudo transversal e 159 de 197 isolados do estudo longitudinal apresentaram positividade para os testes de identificação da espécie *S. aureus*. Na pesquisa do gene *mecA*, 6 isolados do estudo longitudinal foram positivos e os isolados do estudo transversal não apresentaram positividade para este gene.

5.2. Perfil de clonalidade dos isolados

5.2.1. Tipagem *agr*

A Tabela 9 mostra que os grupos *agr* dos isolados estudados (159 no estudo longitudinal e 144 no estudo transversal) classificaram-se em três tipos *agr*, sendo que o grupo IV não foi identificado em nenhum dos isolados.

Tabela 9 - Tipos de *agr* encontrados nos isolados de *S. aureus*, nos estudos longitudinal e transversal

Estudos	Tipos <i>agr</i> n(%)				
	<i>agr</i> -I	<i>agr</i> -II	<i>agr</i> -III	<i>agr</i> -IV	NA
Longitudinal N= 144	43(29,9)	54(37,5)	4(2,7)	0	43(29,9)
Transversal N= 159	40(25,2)	41(25,8)	39(24,5)	0	39(24,5)
Total = 303	83(27,4)	95(31,4)	43(14,2)	0	82(27,0)

N- Corresponde ao n° total de isolados correspondentes aos estudos transversal e longitudinal.

No estudo longitudinal foi detectada a presença de 43 isolados (29,9%) pertencentes a *agr-I*, 54 (37,5%) pertencentes a *agr-II*, e 4 (2,7%) ao tipo *agr-III*. Além disso, 43 isolados (29,9%) não apresentaram grupos *agr*.

Já no estudo transversal, 40 (25,2%) apresentaram o grupo *agr-I*, 41 (25,8%) *agr-II*, 39 (24,5%) *agr-III*; sendo que 39 (24,5%) isolados não apresentaram grupo *agr*.

Um trabalho de Azmi; Qrei; Abdeen (2019) identificou os quatro grupos *agr* em 248 cepas isoladas de pacientes. O grupo mais predominante foi o *agr-I* com 98 cepas (39,5%), seguidas de *agr-II* com 82 (33,1%), *agr-III* com 23 (9,3%), *agr-IV* com 9 (3,6%) e 36 cepas (14,5%) não apresentaram nenhum dos grupos. Outro estudo analisou 194 cepas de *S. aureus* de profissionais da saúde e de alimentos. As cepas apresentaram os quatro grupos *agr*, sendo que *agr-I* (43,3%) apresentou maior prevalência, seguido pelo *agr-III* (28,87%), *agr-II* (22,68%) e *agr-IV* (5,15%). Momtaz et al. (2010), estudaram 86 isolados de leite de gado com mastite e houve maior prevalência do grupo *agr-II* em 42 (36,1%) cepas. Além disso, os autores sugeriram que a localização geográfica pode ser um fator determinante do tipo *agr* que apresenta cada cepa. Comparando os resultados do estudo atual com os estudos antes descritos é possível observar que existe uma ampla diversidade na presença do tipo *agr* entre os isolados.

A não identificação do grupo *agr* nas cepas estudadas no presente estudo, pode ser devido a mutações específicas nos grupos *agr*, o que dificulta o anelamento correto do *primer* (GOR et al., 2019).

5.2.2. Análise da clonalidade dos isolados por PFGE

Os isolados de *S. aureus* dos estudos longitudinal e transversal foram avaliados por PFGE e a análise do perfil de bandas obtido foi realizada no programa BioNumerics versão 7.5 (Applied Maths Kortrijk, Belgium), conforme os critérios de Tenover et al. (1995).

Devido ao fato de os produtores dos queijos do estudo longitudinal também terem fornecido amostras para o estudo transversal, os dois estudos foram analisados em conjunto no programa BioNumerics, totalizando 303 amostras.

5.2.2.1. Análise dos isolados no programa BioNumerics

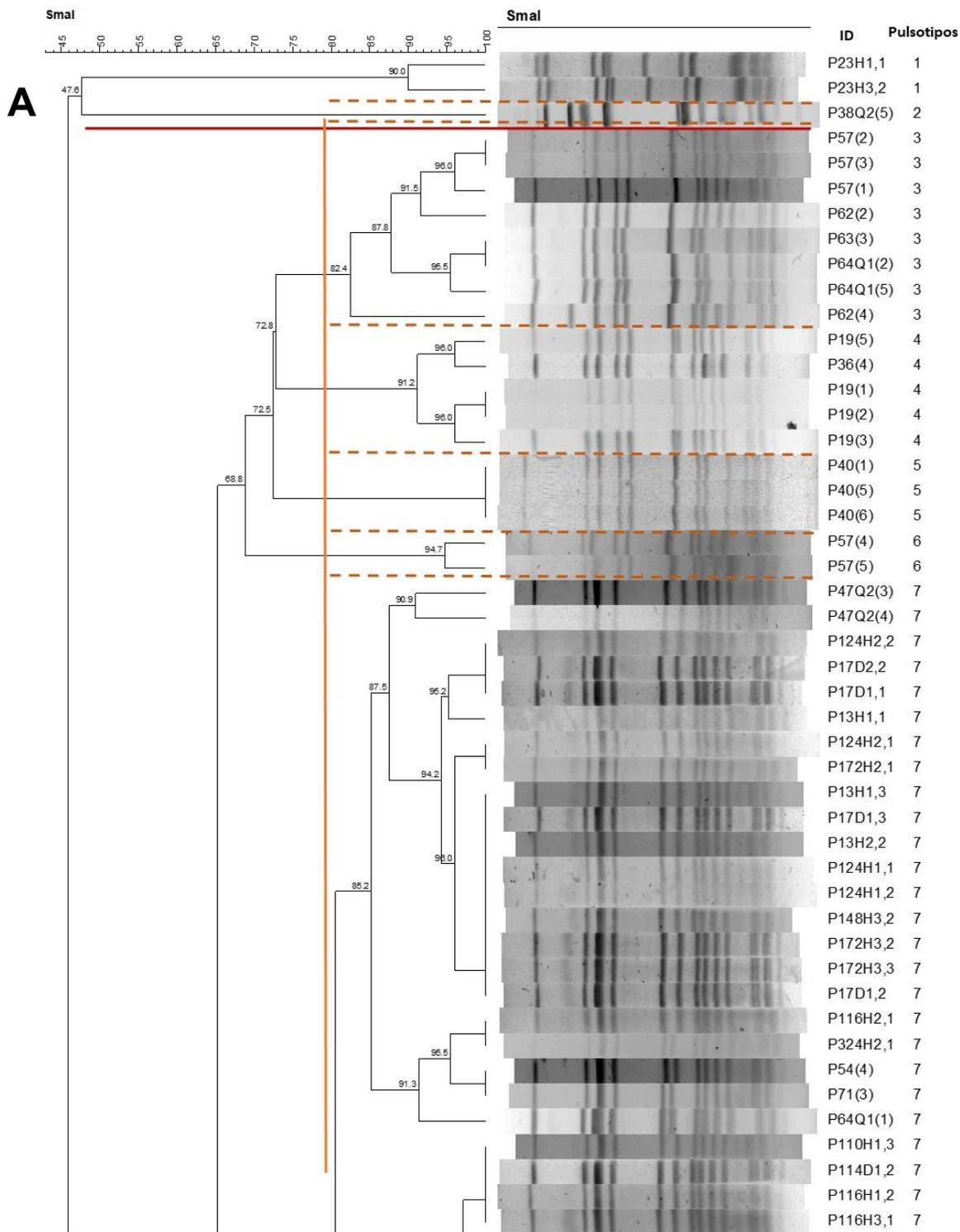
Considerando-se os isolados com similaridade de 80% e os que estão fora desse padrão, o perfil de bandas dos 303 isolados de *S. aureus* obtidos por PFGE mostrou 54 pulsotipos distintos distribuídos em 5 *clusters* (A, B, C, D, E) principais. Os isolados nos 5 *clusters* foram distribuídos da seguinte forma: *cluster* A (3 isolados), *cluster* B (133 isolados), C com maior número (144 isolados), *cluster* D (16 isolados) e *cluster* E (7 isolados). No total, houve a presença de 6 isolados *mecA* distribuídos nos *clusters* A, B e C: no *cluster* A e pulsotipo 1, 2 isolados que pertenciam ao Produtor 2 com 3 horas de maturação; no *cluster* B e pulsotipo 8, 1 isolado que pertencia ao Produtor 3 com 3 horas de maturação; e por último, 3 isolados pertencentes ao Produtor 3, representantes do *cluster* C, 1 isolado situado no pulsotipo 22, com 3 horas de maturação, e os 2 isolados restantes sendo parte do pulsotipo 24, com 16 horas de maturação (Figura 6)

Além disso, pode-se observar que independentemente de os isolados serem de amostras do mesmo local ou produtor, eles podem apresentar diferença clonal e estarem agrupadas em mais de um dos 5 *clusters*. Os resultados apresentados no presente trabalho são similares aos do estudo feito por Tondo et al, 2000, no qual a análise feita por PFGE mostrou que 19 isolados de *S. aureus* de leite de uma mesma fábrica de laticínios não apresentaram relação entre si, mostrando padrões de bandas diferentes entre todos os isolados. O estudo feito por André et al., 2008 avaliou 73 isolados de *S. aureus* de amostras de leite, queijo e mãos de manipuladores e identificou 47 pulsotipos diferentes, que apresentaram alta variabilidade clonal. Estes estudos sugerem que a variabilidade clonal pode ser devido a contaminação cruzada entre os manipuladores de alimentos, leite e queijo (Figura 6).

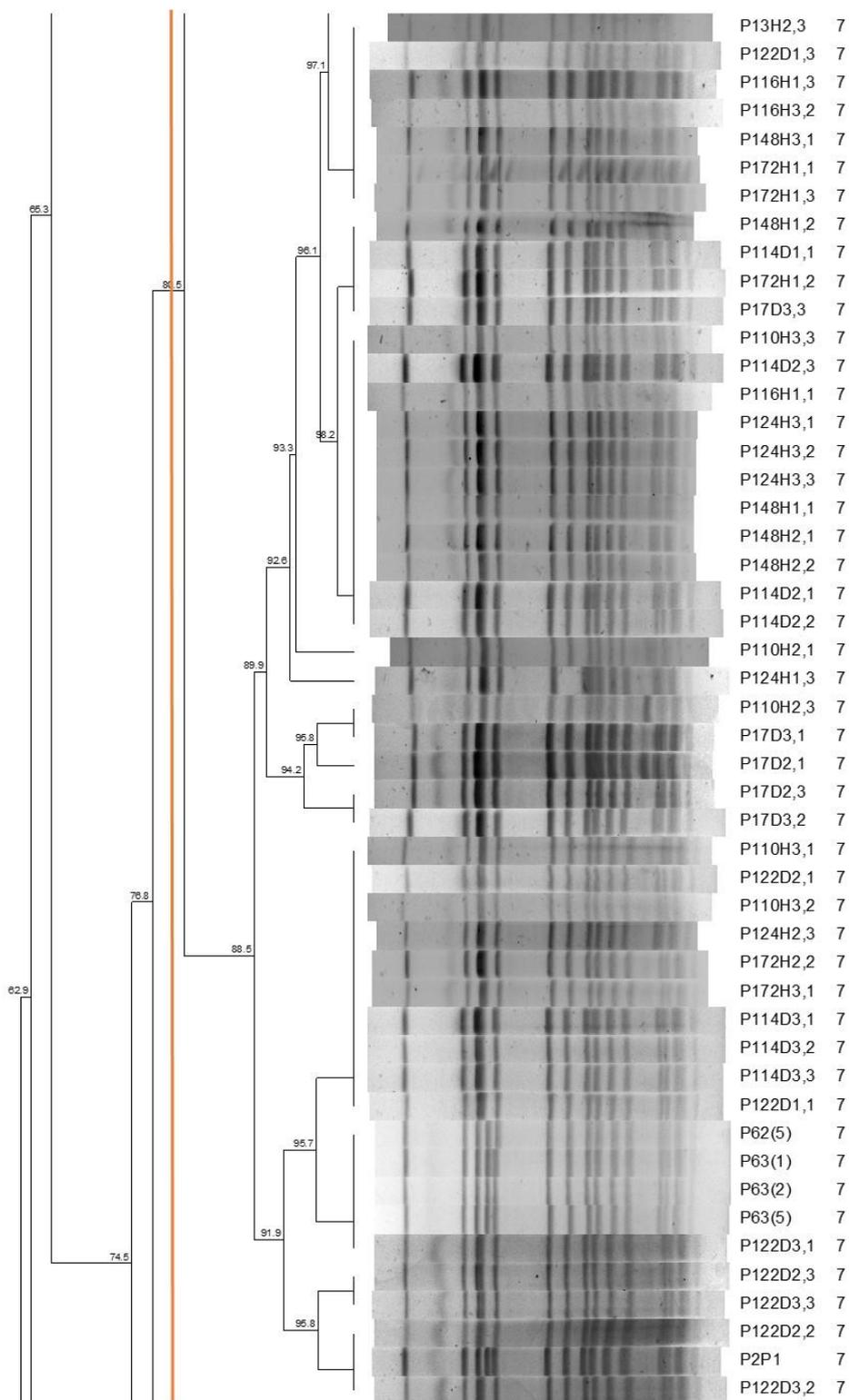
Após a classificação dos *clusters* A, B, C, D, E e os 54 pulsotipos, dos 303 isolados, foi escolhido 1 clone de cada pulsotipo identificado para análises posteriores. Dos 54 clones, 35 foram distribuídos nos *clusters* A, B, C, D, E e vieram de amostras de queijo artesanal obtidas de queijarias do município de São Roque de Minas e 19 foram distribuídos nos *clusters* C, B, D e E oriundos de amostras do município de Medeiros.

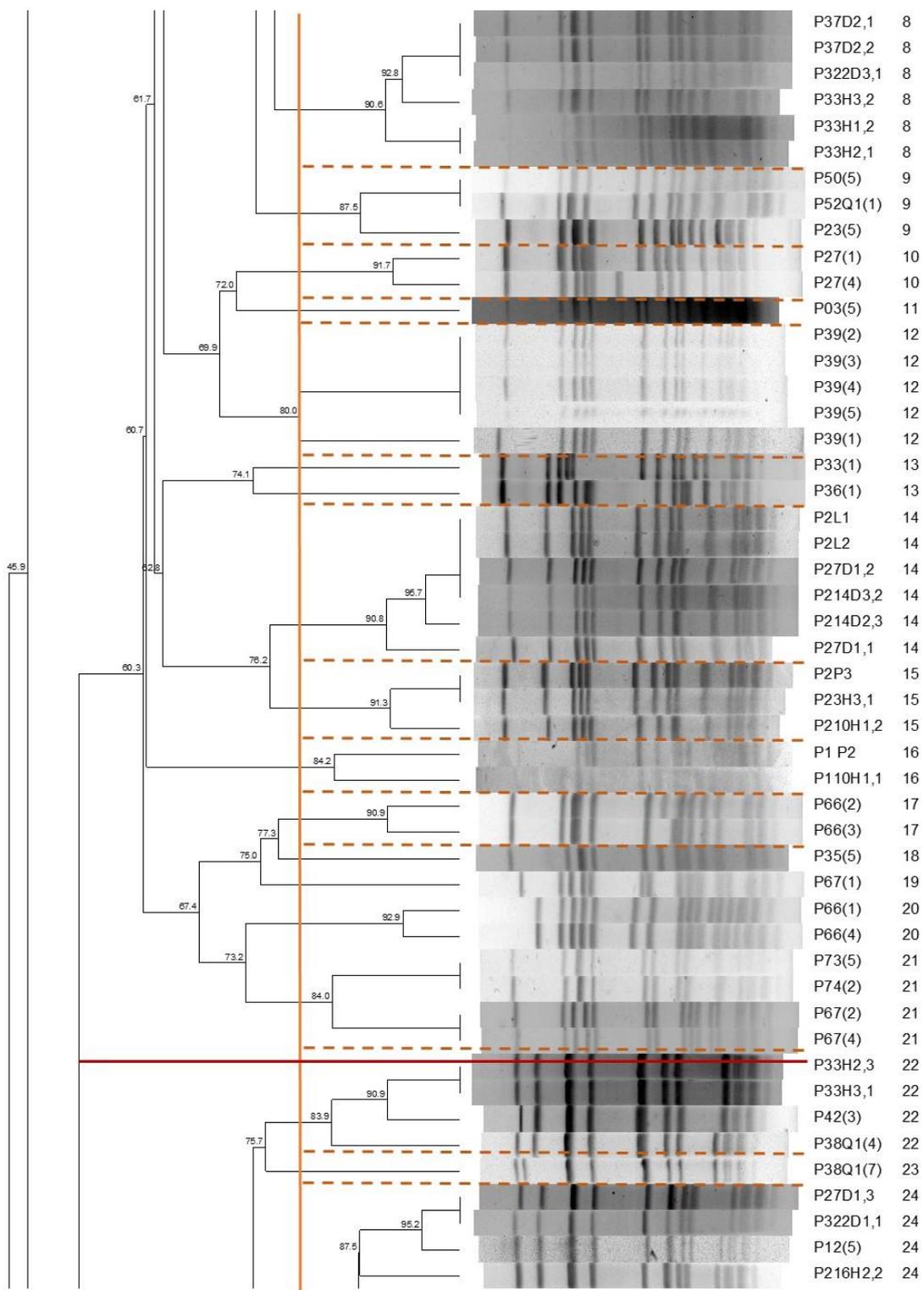
Os pulsotipos 1 e 2, do *cluster A*, apresentaram os genes das enterotoxinas *seh*, *seg*, *seo*, *sem*. O pulsotipo 21 apresentou o gene da enterotoxina *sea* e os pulsotipos 22, 23, 24 e 25 do *cluster C* apresentaram o mesmo perfil de genes de enterotoxinas que o *cluster A*, mas o pulsotipo 26 do *cluster C* somente apresentou *seg* e *seo*. No *cluster B*, o pulsotipo 8 apresentou o gene *sei*, *seg*, e o pulsotipo 11 apresentou os genes *sej*, *seo* e *sem*. O *cluster D* apresentou os pulsotipos 49, 50 e 51. O pulsotipo 49 teve a presença dos genes *seg*, *seo* e *sem*, e para os pulsotipos 50 e 51 os genes *seg* e *seo* foram amplificados. No *cluster E*, o pulsotipo 54 apresentou os genes *seg*, *seo* e *sem* e os pulsotipos 52, 53 e 54 não foram positivos para genes de enterotoxinas.

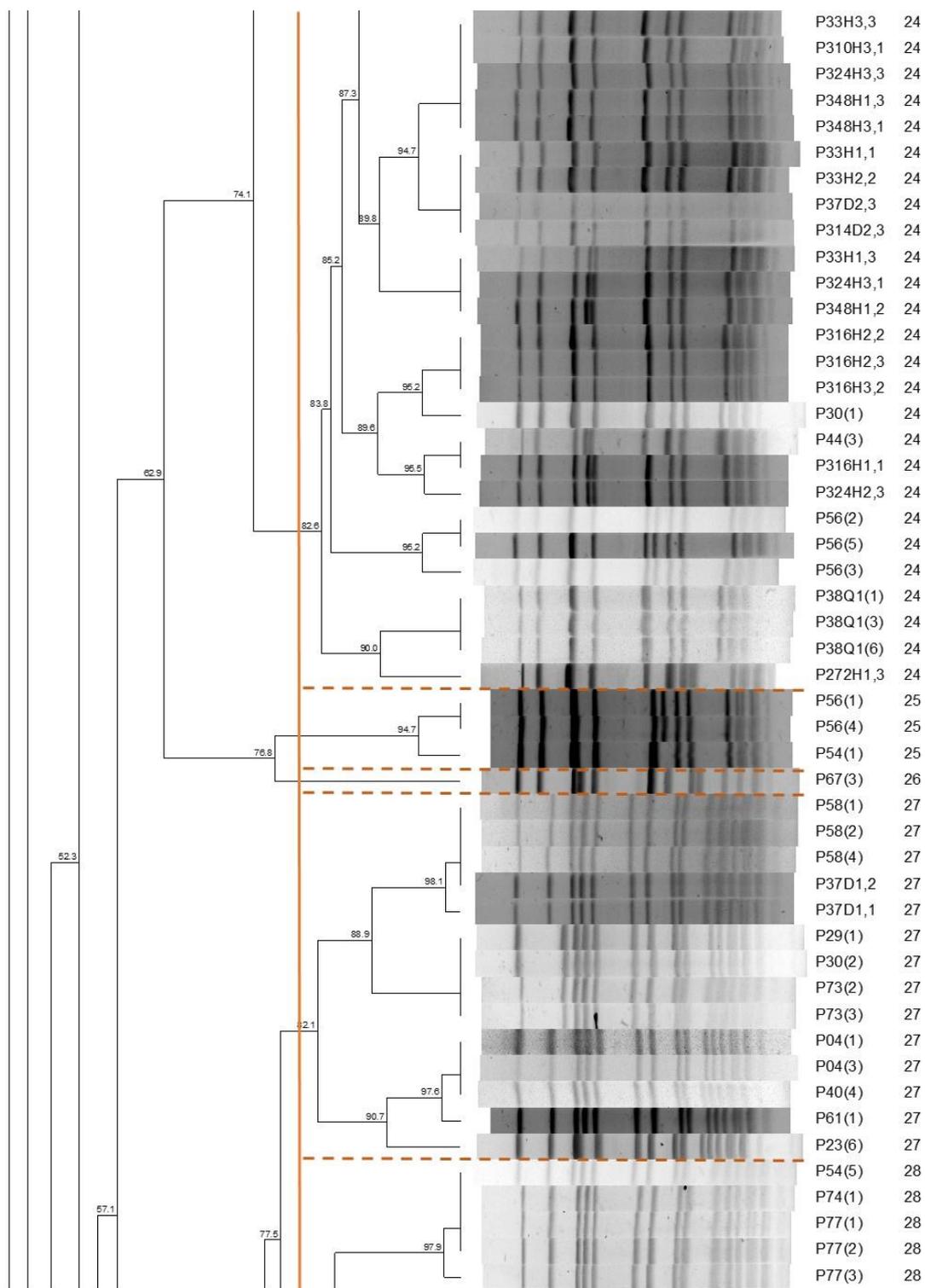
Figura 6 - Dendrograma representando o agrupamento por similaridade dos isolados de *S. aureus*, do estudo longitudinal e transversal em conjunto, após clivagem do DNA total com *Sma*I e separação por PFGE.



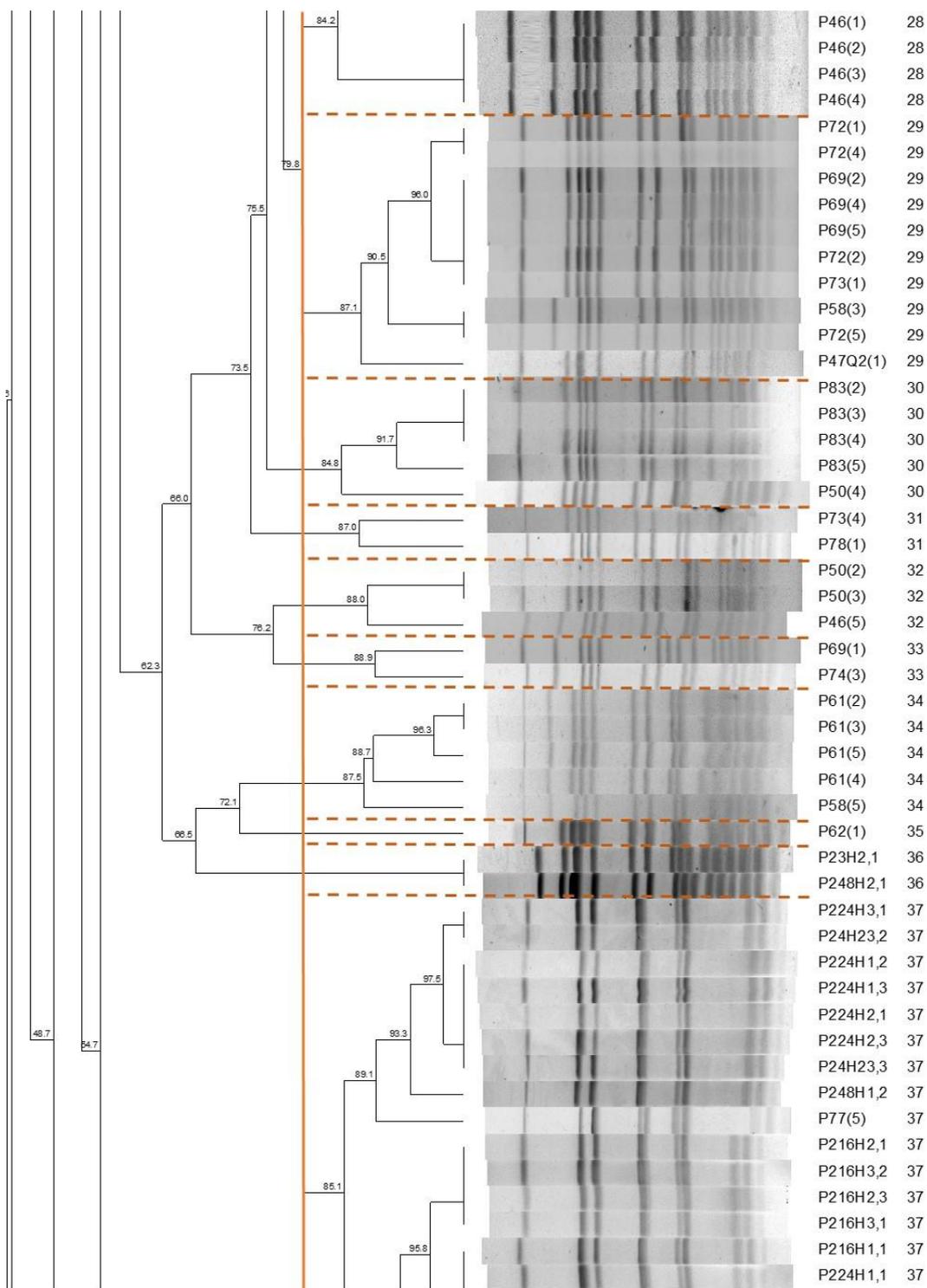
B



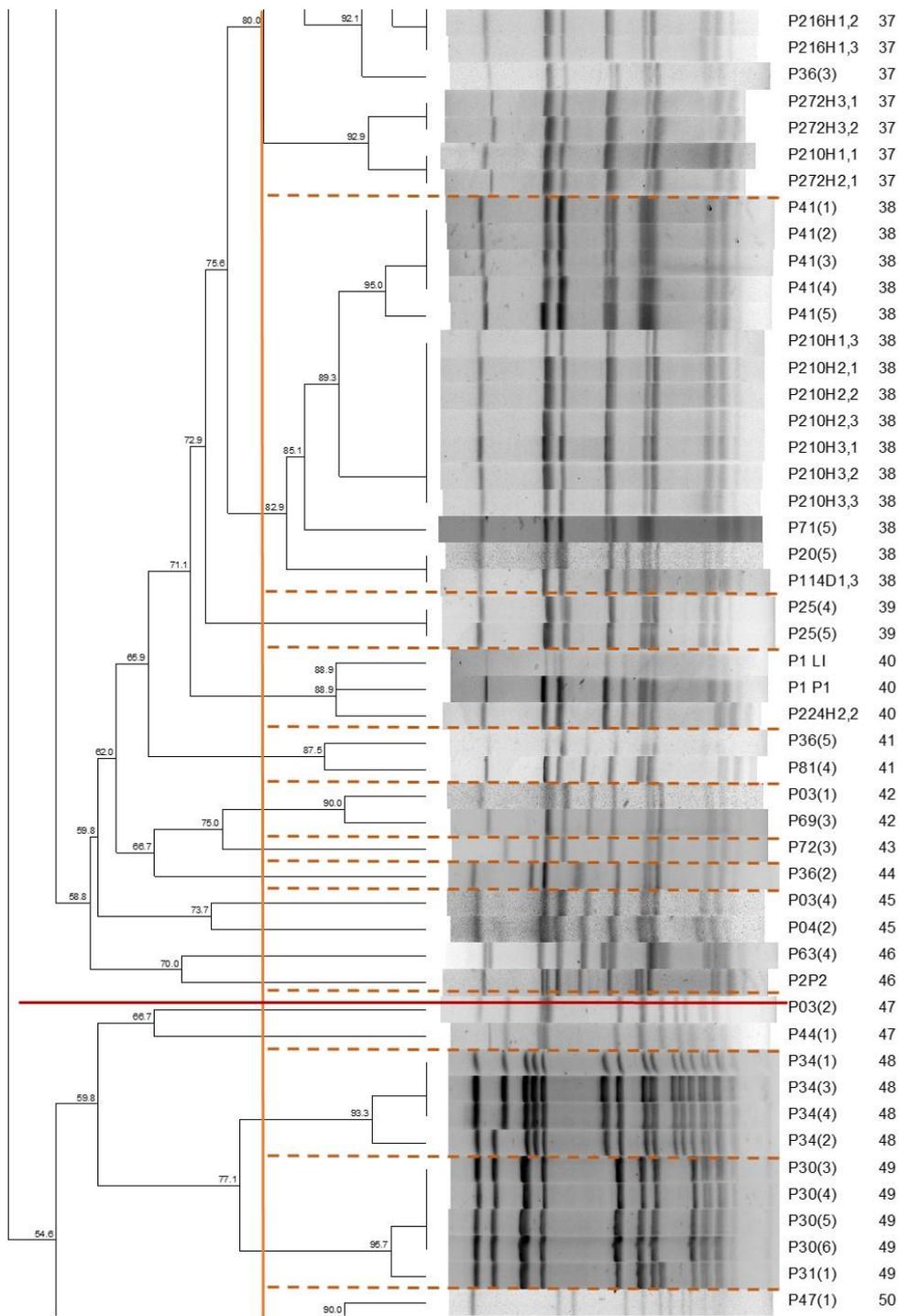


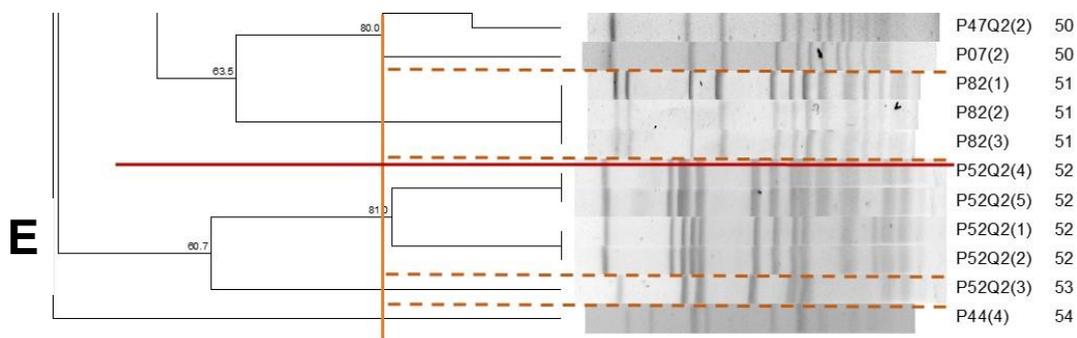


C



D

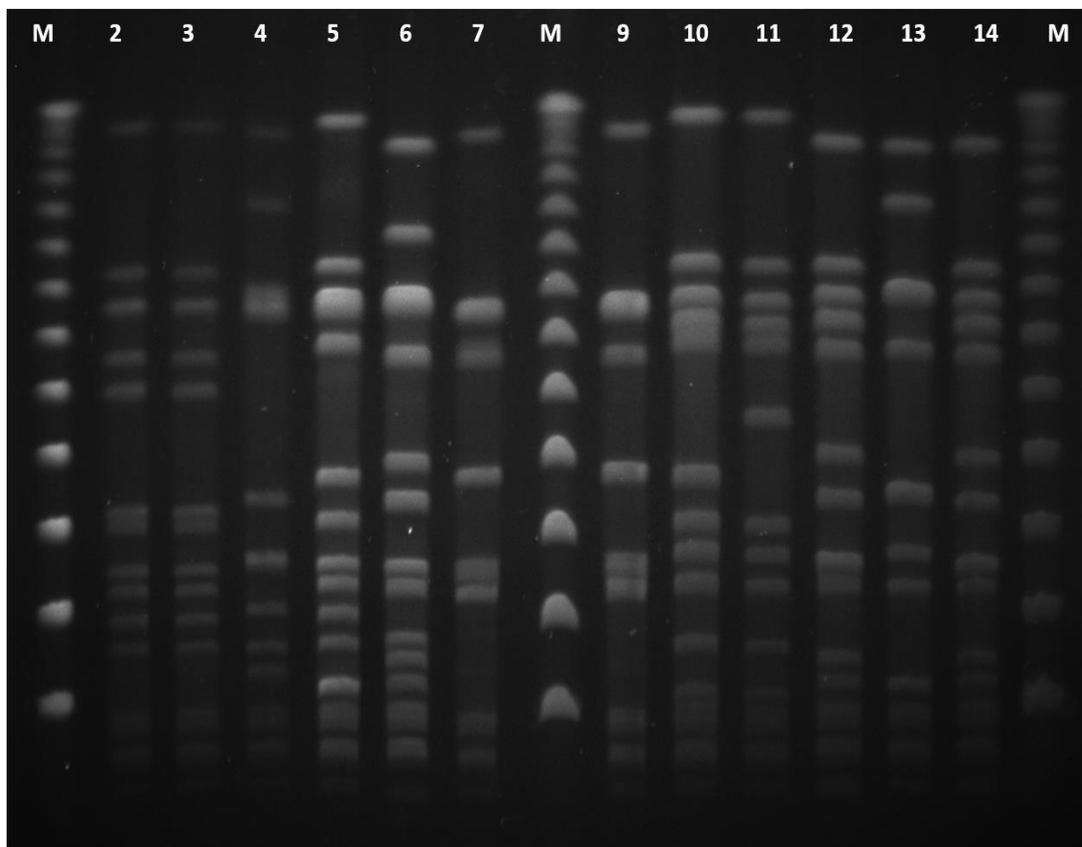




Fonte: Autor

Dendrograma gerado com 303 isolados previamente analisados por meio da técnica PFGE. Para a análise no programa BioNumerics, utilizamos algoritmo de agrupamento UPGMA e o coeficiente de dados Dice. A tolerância de posição da banda foi de 1,25%, otimização de 0,50% e similaridade $\geq 80\%$. ID: identificação do isolado.

Figura 7 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizado a enzima de restrição *SmaI* em isolados de *Staphylococcus aureus*.



M = marcador de peso molecular Lambda ladder PFGE marker (New England Biolabs, UK); demais colunas são perfis de bandas observadas em um transiluminador UV após a realização da eletroforese em campo pulsado e a coloração do gel com brometo de etídeo.

5.2.3. Tipagem *spa*

Do total de 54 isolados de *Staphylococcus aureus* avaliados, foi possível concluir a tipagem de 34 isolados, sendo que para 20 isolados não foi possível determinar o tipo de *spa*. Os 34 isolados sequenciados e analisados foram agrupados em 14 tipos de *spa* diferentes, revelando uma alta diversidade de tipos *spa* nas amostras estudadas. A alta diversidade de tipos *spa* sugere ainda que a contaminação do produto final com *S. aureus* pode ter origem de diferentes fontes.

Os genótipos mais frequentes no presente estudo foram o t127 e t605 (20,58%); t002 (14,70%), seguidos pelos tipos t267 (8,82%); t1234 e t693 (5,8%) e t021, t177, t306, t321, t359, t442, t521, t693 e t5493 (2,9%).

Vários estudos realizados no Brasil relataram alta prevalência de t605 em isolados provenientes de mastite bovina, queijo Minas Frescal e leite, demonstrando que este genótipo é o melhor adaptado na região estudada (RODRIGUES et al., 2017; RABELLO et al. 2007; SILVA et al., 2013; BONSAGLIA et al., 2018). Além disso, o t127 foi encontrado como segundo tipo *spa* mais prevalente no estudo de Rodrigues et al., 2017 e foi associado a surtos de intoxicação alimentar em países como China e Alemanha e também o mesmo tipo de *spa* foi encontrado em amostras de diferentes fontes como queijo, leite cru e manipuladores, que pode indicar contaminação cruzada (YAN et al., 2012; FETSCH et al., 2014).

Em 12 países europeus os tipos *spa* t127 e t605 foram considerados genótipos pouco frequentes de *S. aureus* encontrados em amostras de leite bovino e o tipo t002 foi mais prevalente em isolados de *S. aureus* de humanos (BOSS et al., 2016).

Em outros estudos, os tipos t021 e t177 foram encontrados em isolados de queijos feitos com leite cru, superfícies e mastite bovina (FETSCH et al., 2014).

Vários tipos de *spa* podem ser encontrados em um mesmo ambiente e os mesmos tipos podem ser encontrados em vários países (BOSS et al., 2016) e, possivelmente, as linhagens de *S. aureus* podem evoluir a partir de uma cepa humana ancestral adaptada ao animal. A transmissão de *S. aureus* por contato direto ou consumo alimentar é comum para este microrganismo (LARSEN et al., 2016).

5.3. Pesquisa de fatores de virulência

5.3.1. Pesquisa de genes que codificam toxinas do grupo SAg e hemolisinas

Cepas de *S. aureus* que contém genes codificadores de enterotoxinas são encontradas tanto em animais como em humanos, conforme descrito em vários trabalhos (LARSEN et al., 2000; D'AMICO; DONNELLY, 2011; CHEN; XIE, 2019) e esta é uma das razões pelas quais esse microrganismo pode contaminar os alimentos em todas as etapas da produção (DITTMANN et al., 2017).

No presente estudo, 14 (25,9%) dos 54 isolados estudados foram positivos para, pelo menos, uma das toxinas do grupo SAg. A prevalência total dos genes foi:

sea 1 (1,8%), *seg* e *seo* 14 (25,9%), *seh* 11 (20,3%), *sei* 10 (18,5%), *sej* 7 (12,9%), *sem* 8 (14,8%), e os genes *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* não foram detectados. Foram observados vários perfis, conforme a presença dos genes que codificam as enterotoxinas: dos 14 isolados, 8 foram positivos para os genes *seg*, *sem* e *seo*; 1 foi positivo para os genes *seg*, *sem*, *seo* e *sea*; 3 foram positivos para os genes *seg*, *sei* e *seo*; os genes *sem* e *seo* foram amplificados em 1 isolado e o gene *seg* foi amplificado em outro. Para os genes das hemolisinas, *hla* foi positivo em todos os isolados e *hlb* foi positivo em 53 (98,1%) isolados. (Tabela 10).

Tabela 10 - Prevalência de genes codificadores de SAGs e hemolisinas

Genes SAGs	
	n (%)*
<i>sea</i>	1 (1,8%)
<i>seb</i>	0
<i>sec</i>	0
<i>sed</i>	0
<i>see</i>	0
<i>seg</i>	14 (25,9%)
<i>seh</i>	11 (20,3%)
<i>sei</i>	10 (18,5%)
<i>sej</i>	7 (12,9 %)
<i>seo</i>	14 (25,9%)
<i>sem</i>	8 (14,8%)
<i>tst</i>	0
Hemolisinas	
<i>hla</i>	54 (100%)
<i>hlb</i>	53 (98,1%)

* O número de isolados avaliados foi de 54, conforme definido pela análise PFGE que revelou 54 perfis diferentes dos isolados analisados.

Como esperado, a prevalência de cepas enterotoxigenicas foi também variável em outros estudos (FERREIRA et al., 2016; BELLIO et al., 2019). No estudo de Jørgensen et al. (2005), a prevalência de genes de enterotoxinas presentes em amostras de produtos lácteos feitos de leite cru foi de 37,8%. Um estudo parecido, em que se isolaram *S. aureus* de mastite bovina, genes que codificam para enterotoxinas foram identificados nos 26 isolados avaliados (ARTURSSON et al., 2016). Em outro trabalho feito por Larsen et al. (2000), 141 cepas de mastite bovina foram isoladas, das quais apenas 1 apresentou o gene que codifica *tst*. Em outro estudo por Dittmann

et al., (2017), a presença do gene *see* em isolados de amostras de 5 fazendas produtoras de lácteos não foi identificada; as amostras analisadas foram de superfícies de contato com alimentos, superfícies que não tinham contato com o alimento e os produtos produzidos. Além disso, os genes *sea* e *seh* apresentaram alta prevalência em cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite, queijos e produtos lácteos. Já os genes *sem* e *seo* apresentaram menor prevalência em amostras de leite.

Os estudos anteriormente mencionados indicam que o conhecimento das cepas que circulam em um determinado local pode contribuir ao desenvolvimento de vacinas contra a mastite bovina. Na indústria, a rápida detecção contribuiria para o desenvolvimento rápido de estratégias para prevenir a contaminação dos produtos, reduzindo perdas econômicas, assim como intoxicações alimentares.

Além de identificar genes de enterotoxinas, alguns trabalhos investigaram a capacidade do microrganismo de produzir as enterotoxinas (NORMANNO et al., 2005; LAMPUGNANI et al., 2019). Em um estudo, 24 isolados que possuíam o gene que codifica SEA, SEB, SEC, SED ou TSST-1 também produziram as toxinas (ARTURSSON et al., 2016). De acordo com a análise quantitativa de ELISA, SEA, SEB e SED foram produzidas em níveis baixos, 0-20 ng/ml, enquanto a produção de SEC e TSST-1 foi consideravelmente maior, 100-1000 ng/ml (ARTURSSON et al., 2016). Outras pesquisas mostraram que a presença da enterotoxina SEH em produtos lácteos foi responsável por intoxicações (IKEDA et al., 2005; JØRGENSEN et al., 2005; OSTYN et al., 2010).

As hemolisinas, ou também conhecidas como toxinas alfa (α) e beta (β), são codificadas pelos genes (*hla* e *hlb*). No presente trabalho, dos isolados avaliados, todos foram positivos para o gene *hla* e 53 isolados (98,1%) para o gene *hlb*.

As hemolisinas são consideradas responsáveis pela lise dos glóbulos vermelhos (BURNSIDE et al., 2010). O gene da toxina α está presente em casos de pneumonia, sepse, artrite séptica, abscesso cerebral, infecções de córnea, e apresenta maior atividade hemolítica em células de coelhos (BURNSIDE et al., 2010). Essa toxina formadora de poros nas células está presente na maioria de isolados. Além

disso, alguns dos isolados também secretam a toxina β , que é codificada pelo gene *hlb*, que ao contrário da toxina α , é altamente hemolítica para eritrócitos de ovinos, e está presente em infecções de pulmão e córnea (BURNSIDE et al., 2010). As hemolisinas têm a capacidade de permanecer nas glândulas mamárias, sendo determinantes no agravamento da mastite bovina e representam uma fonte de contaminação do leite (FERREIRA et al., 2016). Outro achado importante é que o gene *hlb* está frequentemente presente em isolados de infecção de glândulas mamárias, e por isso pode-se sugerir que os genes *hlb* identificados nos *S. aureus* isolados de queijos neste estudo estão relacionados com essa infecção (FERREIRA et al., 2016).

5.3.2. Avaliação genotípica e fenotípica da produção de biofilme

5.3.2.1. Detecção de genes MSCRAMMS

Os genes MSCRAMMS, que codificam a produção de proteínas de membrana (KHORAMIAN et al., 2015), estão envolvidos na formação de biofilme, que é uma característica associada a virulência bacteriana e contribui na adesão às células do hospedeiro, causando infecções crônicas, assim como a contaminação de alimentos na indústria (KHORAMIAN et al., 2015; AZMI; QREI; ABDEEN, 2019).

No presente estudo, cada um dos 54 isolados apresentaram no mínimo três genes codificadores de MSCRAMMS. O número de isolados que possuíam os genes *icaA* e *icaD* foi de 38 (70,3%) e 25 (46,2%), respectivamente. Além disso, apresentaram positividade para os genes: *fnbA* e *fnbB* 18 (33,3%), *clfA*, *clfB* e *eno* 53 (98,1%), *fib* 44 (81,4%), *bbp* 4 (7,4%), *bap* 2 (3,7%), *cna* 17 (31,4%), *ebps* 10 (18,5%) (Tabela 11).

Tabela 11 - Prevalência de genes codificadores de proteínas de membrana.

Genes MSCRAMMS	
	n (%)*
<i>fnbA</i>	18 (33,3%)
<i>fnbB</i>	18 (33,3%)
<i>clfA</i>	53 (98,1%)
<i>clfB</i>	53 (98,1%)
<i>icaA</i>	38 (70,3%)
<i>icaD</i>	25 (46,2%)
<i>bap</i>	2 (3,7%)
<i>eno</i>	53 (98,1%)
<i>fib</i>	44 (81,4%)
<i>bbp</i>	4 (7,4%)
<i>cna</i>	17 (31,4%)
<i>ebps</i>	10 (18,5%)

* O número de isolados avaliados é de 54, conforme definido pela análise PFGE que revelou 54 perfis clonais diferentes nos isolados analisados.

Vários estudos concordam com a importância da presença do locus *ica* (*icaA* e *icaD*) em *S. aureus*, porque determinam a capacidade da adesão intracelular na formação de biofilme, com a síntese de Polissacarídeo de Adesão Intercelular (*Polysaccharide Intercellular Adhesin* – PIA) (MARTIN-LOPEZ et al., 2002; AZMI; QREI; ABDEEN, 2019). No presente estudo, uma alta prevalência dos genes *icaA* 36 (70,5%) e *icaD* 24 (47,0%) poderiam explicar a alta prevalência 44 (86,2%) de isolados formadores de biofilme, conforme mostrado adiante (Gráfico 1).

No trabalho feito por Azmi; Qrei e Abdeen (2019), foram estudados 248 isolados de *S. aureus* de humanos, sendo que 207 (83,5%) possuíam o gene *icaD* e em 41 (16,5%) não foi detectado o gene. No entanto, os 41 isolados foram positivos para o gene *icaA*. O gene *fnbB* (29%) foi detectado em menor frequência, assim como no presente estudo. Este gene apresentou-se em baixas porcentagens, independente da formação de biofilme, mesmo sendo considerado importante na invasão e na aderência de bactérias às células do hospedeiro. Porém, vale ressaltar que o teste para formação de biofilmes foi realizado em placas de poliestireno que não representam as mesmas condições das células do hospedeiro. Os genes *clfA* e *clfB* apresentaram alta prevalência (82,7%) nos isolados, semelhante ao presente estudo. Em outro estudo de Falaki e Mahdavi (2017) trabalharam com 17 isolados de *S.*

aureus obtidos de queijo, no qual se identificou genes MSCRAMMS, como *icaA* (76,47%), *clfB* (76,47%), *icaD* (58,82%) e *fnbA* (64,7%), e 5 cepas (29,41%) incluíram todos os genes pesquisados.

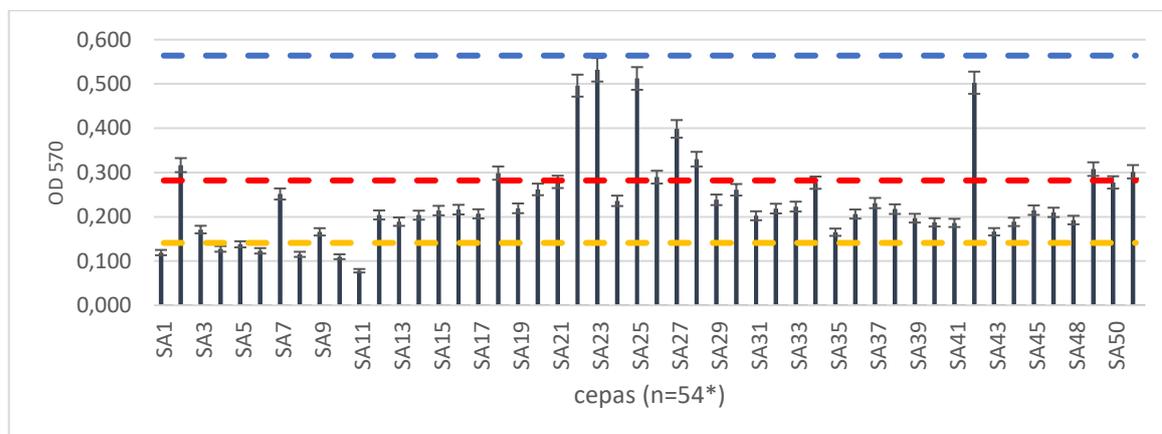
Em um estudo realizado por Khoramian et al. (2015), genes codificadores de proteínas MSCRAMMS foram detectados na maior parte dos isolados estudados, como no presente estudo, e observaram que as cepas de *S. aureus* isoladas de humanos e de infecções em vacas leiteiras não apresentaram diferença significativa na prevalência dos genes *eno*, *fnbB*, *fib*, *cna*, *ebps*, *icaA* e *icaB*. No entanto, a presença de *fnbB*, *fib* e *eno* foi maior entre isolados animais nos diferentes grupos de formação de biofilme. O gene *bap* não foi detectado em nenhum dos isolados.

Esses estudos sugerem que a variabilidade da presença de genes MSCRAMMS pode ser devido ao fato de algumas cepas usarem outros sistemas para formarem biofilme. Além disso, são necessários testes de expressão genética para um melhor entendimento da importância dos genes na formação de biofilme.

5.3.2.2. Triagem para formação de biofilmes com o teste de cristal violeta em placas.

Foi realizada a classificação dos isolados de *S. aureus* escolhidos a partir do PGFE, de acordo com a formação de biofilme. Cada isolado foi testado em triplicata e em duas repetições. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Gráfico representativo da formação de biofilme por isolados de *S. aureus* provenientes de queijo artesanal da Canastra



* O número de isolados avaliados é de 54, conforme definido pela análise PFGE que revelou 54 perfis diferentes dos isolados analisados. Alguns isolados não estão identificados no gráfico por falta de espaço na legenda do eixo X.

No gráfico de barras, as linhas pontilhadas delimitam as faixas de produção de biofilme, sendo que abaixo da primeira ($DO_c = 0,141$) a cultura foi classificada como não formadora de biofilme; entre a primeira e a segunda linha ($2 \times DO_c = 0,282$) como fracamente formadora; entre a segunda e a terceira linha ($4 \times DO_c = 0,564$) como moderadamente formadora; e acima da terceira linha como fortemente formadora de biofilme.

A Tabela 13 mostra a porcentagem total de isolados estratificados conforme a capacidade de formar biofilmes, de acordo com Stepanovic et al. (2000).

Tabela 13 - Classificação de aderência na formação de biofilme por *S. aureus* isolado de queijo artesanal da Canastra

Classificação da aderência	Porcentagem (%)
Não formador	13,7
Fracamente formador	60,8
Moderadamente formador	25,5
Fortemente formador	0

* O número de isolados avaliados é de 54, conforme definido pela análise PFGE que revelou 54 perfis diferentes dos isolados analisados

A presença de biofilmes na indústria de laticínios é de grande preocupação, podendo ser consequência da falta de monitoramento da higiene nos diferentes processos de produção (STEPANOVIĆ et al., 2000).

Em um estudo feito por Lee et al. (2014), a capacidade de formação de biofilme de 31 isolados de *S. aureus* de fazendas leiteiras, utilizando diferentes superfícies como poliestireno, aço inoxidável, borracha e silicone foi avaliada. Os resultados mostraram que 14 (45,2%) isolados foram produtores de biofilme no ensaio de microplacas de poliestireno, enquanto 13 (41,9%) foram produtores de biofilme em aço inoxidável e 12 (38,7%) em borracha. Nenhum dos isolados produziu biofilmes em silicone. Em outro trabalho, utilizando o teste de placas de poliestireno, 9 isolados (29,0%) foram produtores fracos, 2 (6,5%) foram produtores moderados, 3 (9,7%) produtores fortes e 17 (54,8%) não formaram biofilme (THIRAN et al., 2018). Esses resultados são discrepantes ao do presente estudo, onde 44 (86,2%) isolados produziram biofilme, sendo que 60,8% foram fracos formadores de biofilme, 25,5% moderados e nenhum foi forte formador. De acordo com os resultados dos trabalhos mencionados, pode-se observar que existe uma grande variabilidade na produção de biofilme entre as cepas dos estudos e isso pode ser por causa das diferentes técnicas de *screening* de formação de biofilme e a pouca reprodutibilidade dos mesmos. Os estudos sugerem uma avaliação dos métodos já utilizados com o intuito de identificar quais dos testes se assemelham às condições da indústria de laticínios, assim como a avaliação das condições de crescimento (pH, tempo, nutrientes) e o material em que será realizado o teste. Esses parâmetros são fundamentais para a formação de

biofilme, além do tipo de interpretação dos resultados, que pode influenciar nas classificações (THIRAN et al., 2018).

5.4. Susceptibilidade a antimicrobianos

Quarenta e cinco isolados (83,3%) apresentaram resistência a antibióticos, e 7 (13%) apresentaram resistência intermediária. Além disso, um isolado foi resistente a 5 dos 15 antibióticos testados. Por outro lado, a penicilina apresentou maior porcentagem de isolados resistentes, com 25 (46,3%) de 54 isolados estudados. Esses dados corroboram com os resultados do estudo de Wang et al. (2018), no qual 30 (31,3%) das 96 cepas de *S. aureus* provenientes de leite cru apresentaram maior resistência a penicilina. No estudo de D'amico e Donnelly (2011), 90 cepas de isolados de leite cru apresentaram resistência a penicilina, representando 17,04% dos isolados. No presente estudo, o segundo antibiótico com maior resistência foi a tetraciclina, em 13 isolados (24,1%), além de apresentar resistência intermediária em outros 5 isolados (9,3%). Esses resultados são semelhantes aos de Kumar; Yadav e Singh (2010), que avaliaram 128 isolados de *S. aureus* a partir de leite de vacas com mastite e apresentaram alta prevalência (36,7%) de isolados resistentes a tetraciclina. Esses antibióticos são utilizados com maior frequência na pecuária, o que pode explicar a resistência observada na literatura em cepas de *S. aureus* isoladas de produtos de origem animal (JARDIM et al., 2014).

Assim como no presente trabalho, André et al. (2008) não encontraram isolados resistentes a clindamicina, nem a gentamicina ao longo da cadeia de produção de queijos, o que condiz com o presente estudo, que apresentou apenas 1 cepa (1,8%) resistente a clindamicina, e 1 cepa (1,8%) com resistência intermediária a gentamicina, e nenhuma cepa com resistência a ciprofloxacina. Segundo a literatura, estes antibióticos são comumente usados no Brasil para tratar mastite bovina (JARDIM et al., 2014).

Os 54 isolados foram susceptíveis aos antibióticos rifamicina, cloranfenicol, nitrofurantoina, linezolida e ciprofloxacina, conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus aureus*.

Agente antimicrobiano	Susceptibilidade a antimicrobianos n° (%)		
	Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Eritromicina (ERI)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Tetraciclina (TET)	13 (24,0%)	8 (14,8%)	33 (61,1%)
Cefoxitina (CFO)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Penicillina (PEN)	25 (46,3%)	-	29 (53,7%)
Clindamicina (CLI)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Rifamicina (RIF)	-	-	54 (100%)
Cloranfenicol (CLO)	-	-	54 (100%)
Gentamicina (GEN)	1 (1,8%)	3 (5,5%)	50 (92,6%)
Tombramicina (TOB)	-	1(1,8%)	53 (98,1%)
Cotrimazol (SUT)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Azitromicina (AZI)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Nitrofurantoina (NIT)	-	-	54 (100%)
Linezolida (LNZ)	-	-	54 (100%)
Trimetropin (TRI)	1 (1,8%)	-	53 (98,1%)
Ciprofloxacina (CIP)	-	-	54 (100%)

* O número de isolados avaliados é de 54, conforme definido pela análise PFGE que revelou 54 perfis diferentes dos isolados analisados. Outros 3 isolados ainda serão avaliados neste estudo.

Os trabalhos sugerem que uma rápida detecção e identificação do microrganismo pode contribuir com uma intervenção com antibióticos de forma eficaz, evitando a disseminação do microrganismo dentro e fora do rebanho.

6. CONCLUSÃO

Foram confirmados 303 isolados de *S. aureus* de queijo minas artesanal da Canastra, conforme testes bioquímicos e amplificação do gene *nuc*, específico para a espécie.

Foi detectado o gene *mecA* o qual verifica a presença de *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) em 6 (1,9%) dos 303 isolados.

A tipagem *agr* revelou que 83 (27,4%) dos isolados são do tipo *agr*-I, 95 (31,4%) *agr*-II e 43 (14,2%) *agr*-III, sendo que não foram detectados isolados classificados como *agr*-IV.

A tipagem por PFGE revelou um total de 54 perfis. Para esta parte do estudo, um isolado representativo de cada perfil, no total de 54, foi utilizado nos demais testes que mostraram a presença dos genes do grupo SAs, *sea* 1 (1,8%), *seg* e *seo* 14 (25,9%), *seh* 11 (20,3%), *sei* 10 (18,5%), *sej* 7 (12,9%), *sem* 8 (14,8%), e os genes *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* não foram detectados. Para os genes das hemolisinas, *hla* foi positivo em todos os isolados e o *gene hlb* foi positivo em 53 (98,1%) isolados. Além disso, os genes positivos para MSCRAMMS foram *fnbA*, *fnbB* 18 (33,3%), *clfA*, *clfB* e *eno* 53 (98,1%), *fib* 44 (81,4%) e *bbp* 4 (7,4%), *cna* 17 (31,4%) e *ebps* 10 (18,5%). Por último, os genes de formação de biofilme *icaA* e *icaD* estiveram presentes em 38 (70,3%) e 25 (46,2%) dos isolados, respectivamente.

A tipagem por *spa typing* revelou que os tipos mais frequentes foram t127 e t605 20,58%, t002 14,70%, seguidos pelos tipos t267 8,82%, t1234 e t693 5,8% e t021, t177, t306, t321, t359, t442, t521, t693 e t5493 2,9%.

Na avaliação de susceptibilidade a antibióticos dos 54 isolados escolhidos, 25 (46,3%) apresentaram maior resistência a penicilina e 13 (24,0%) a tetraciclina. Em menor porcentagem, eritromicina, cefoxitina, clindamicina, gentamicina, contrimazol, azitromicina e trimetropim com 1 isolado cada (1,8%). Além disso, 8 isolados (14,8%) apresentaram resistência intermediária a tetraciclina, 3 (5,5%) a gentamicina e 1 (1,8%) a tobramicina.

No teste para a determinação da formação de biofilme por cristal violeta, foram classificados em isolados não formadores, fracamente formadores, moderadamente formadores e fortemente formadores, 13,7%, 60,8% 25,5% e 0% dos mesmos, respectivamente.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A combinação dos métodos genotípicos e fenotípicos utilizados para a caracterização deste microrganismo é de grande relevância para detectar o potencial de virulência. Além disso, estas técnicas contribuem para a identificação e melhor entendimento do perfil genético das cepas que circulam nas fazendas produtoras na região da Serra da Canastra.

A elevada prevalência de *S.aureus*, a presença de genes que codificam a produção de toxinas e a detecção de estirpes MRSA, são aspectos que criam uma alerta com relação a inocuidade destes produtos.

A caracterização de *S. aureus* e os seus determinantes de virulência são importantes para melhorar a avaliação de risco e desenvolver soluções para evitar a disseminação deste agente patogénico.

A alta prevalência de genes codificadores de SEs não clássicas (SEG, SEH e SEI) é relevante, pois estes têm sido implicados em surtos de intoxicação alimentar.

Integrar medidas como o uso de testes comerciais com eficácia comprovada para a detecção das toxinas não clássicas, contribuiria ao controle de segurança do alimento para análise de SEs de alimentos.

Este estudo enfatiza na necessidade de melhores práticas de higiene durante o processamento deste grupo de alimentos, com o fim de evitar a presença de isolados de *S. aureus* e SEs e assim, minimizar os riscos potenciais à saúde dos consumidores.

Deveria se incluir um programa de educação sanitária para produtores e o pessoal da ordenha com foco em higiene, para garantir e promover a segurança dos produtos, oferecendo uma boa qualidade para os consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Produção de queijo no Brasil. **Associação Brasileira das indústrias de Queijo**, 2016. Disponível em: <<http://portaldoqueijo.com.br/noticias/2016/11/11/crescimento-do-mercado-de-queijos-no-brasil/>>. Acesso em: 11 out. 2019.

ACOSTA, A. C.; MATIUZZI COSTA, M.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 252, 7 maio 2018.

AL-OBAIDI, M. M. J.; SUHAILI, Z.; DESA, M. N. M. Genotyping Approaches for Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus*. In: **Genotyping**. [s.l.] InTech, 2018.

ALLAION, J.R; BARRIONUEVO, K.G.; FRANCO, B.D.G.D.M. Assessing the Microbiological Safety Parameters of Minas Artisanal Cheese Samples in Retail Environments in São Paulo, Brazil. **Applied Sciences**. 2021;

AMARANTE, J. O. Queijos do Brasil e do mundo. In: SUMMUS (Ed.). 1. ed. [s.l.: s.n.]p. 352.

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

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. **Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins**, 2010. .

ARMANI, M.; MACORI, G.; GALLINA, S.; TAVELLA, A.; GIUSTI, M.; PAOLAZZI, G.; TRENTINI, L.; RABINI, M.; DECASTELLI, L. **Coagulase positive staphylococci and food poisoning toxins-a case study of an outbreak investigation occurred in a sheperd hut***International Journal of Infectious Diseases*, 2016. .

ARTURSSON, K.; SÖDERLUND, R.; LIU, L.; MONECKE, S.; SCHELIN, J. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. **Veterinary Microbiology**, v. 193, p. 156–161, set. 2016.

ASADOLLAHI, P.; FARAHANI, N. N.; MIRZAI, M.; KHORAMROOZ, S. S.; VAN BELKUM, A.; ASADOLLAHI, K.; DADASHI, M.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–16, 12 fev. 2018.

AYEPOLA, O. O.; OLASUPO, N. A.; EGWARI, L. O.; BECKER, K.; SCHAUMBURG, F. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of staphylococcus aureus isolates from clinical infection and asymptomatic carriers in Southwest Nigeria. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 4–11, 2015.

AZMI, K.; QREI, W.; ABDEEN, Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*, v. 20, n. 1, p. 578, 12 dez. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 578, 12 dez. 2019.

BECKER, S.; FRANKEL, M. B.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1574–1579, 28 jan. 2014.

BELLIO, A.; CHIESA, F.; GALLINA, S.; MANILA BIANCHI, D.; MACORI, G.; BOSSI, D.; NIA, Y.; MUTEL, I.; MESSIO, S.; HENNEKINNE, J. A.; DECASTELLI, L. Insight into the distribution of staphylococci and their enterotoxins in cheeses under natural conditions. **Frontiers in Microbiology**, 2019.

BENKERROUM, N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 12, p. 1943–1970, 13 ago. 2018.

BERGDOLL, M.S. & WONG, A. C. . Staphylococccal intoxications,. In: CLIVER, D., POTTER, M., AND RIEMANN, H. P. (Ed.). *Foodborne Infections and Intoxications*. **Academic Press**. [s.l: s.n.]p. 523–556.

BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J.; DOYLE, MICHAEL P., 1949-. BOOK REVIEW. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 12, n. 1, p. 103–106, jan. 2003.

BHATI, T.; NATHAWAT, P.; SHARMA, S. K.; YADAV, R.; BISHNOI, J.; KATARIA, A. K. Polymorphism in spa gene of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. **Veterinary World**, 2016.

BONSAGLIA, E. C.R.; SILVA, N. C.C.; ROSSI, B. F. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Microb. Pathogenesis**, v. 124, p. 130-135, 2018.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra

cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 545–550, 2006.

R. Boss, A. Cosandey, M. Luini, K. Artursson, M. Bardiau, F. Breitenwieser, et al. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. **Journal of Dairy Science**, 99, pp. 515-528. 1 jan 2016.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, dez 2007.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148–1165, 25 maio 2010.

BURNSIDE, K.; LEMBO, A.; DE LOS REYES, M.; ILIUK, A.; BINHTRAN, N.-T.; CONNELLY, J. E.; LIN, W.-J.; SCHMIDT, B. Z.; RICHARDSON, A. R.; FANG, F. C.; TAO, W. A.; RAJAGOPAL, L. Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11071, 11 jun 2010.

CAMPOS, G. Z.; LACORTE, G. A.; JURKIEWICZ, C.; HOFFMANN, C., LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M., et al. Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control** 121:107598, 2021

CANOVAS, J.; BALDRY, M.; BOJER, M. S.; ANDERSEN, P. S.; GRZESKOWIAK, P. K.; STEGGER, M.; DAMBORG, P.; OLSEN, C. A.; INGMER, H.; INGMER, H. Cross-Talk between *Staphylococcus aureus* and Other Staphylococcal Species via the quorum Sensing System. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. November, p. 1733, 2016.

CAMARGO, A.C.; DE ARAÚJO, J.P.A.; FUSIEGER, A.; DE CARVALHO, A.F.; NERO LA. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Braz J Microbiol.** 2021 Mar;52(1):393-409, 2021.

CARD, R.; VAUGHAN, K.; BAGNALL, M.; SPIROPOULOS, J.; COOLEY, W.; STRICKLAND, T.; DAVIES, R.; ANJUM, M. F. Virulence characterisation of *Salmonella enterica* isolates of differing antimicrobial resistance recovered from UK livestock and imported meat samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–11, 2016.

CARDOSO, V. M.; DIAS, R. S.; SOARES, B. M.; CLEMENTINO, L. A.; ARAÚJO, C. P.; ROSA, C. A. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 743–749, set. 2013.

CARVALHO, L. G.; AFONSO, M. A.; FABRI, R. L.; APOLÔNIO, A. C.; MORAIS. "Staphylococcus aureus biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging" **International journal of dairy technology** 74, no. 3: 575-580, 2021.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte, MG (Brazil). **Rev. Microb.**, p. 320–323, 1990.

CERQUEIRA, E. S.; ALMEIDA, R. C. Artigo de Revisão/Review Article. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 268–81, 2013.

CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 30–39, 2009.

CHEN, Q.; XIE, S. Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 307, 29 maio 2019.

CHENG, W.N.; HAN, S.G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas. J Anim Sci* 33(11):1699-1713. 2020.

CLSI. M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. [s.l.] **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2019.

COSTA, G. M.; PEREIRA, U. de P.; CUSTÓDIO, D. aparecida da C.; SILVA, N. da. Caracterização de *Staphylococcus coagulase-positiva* utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 584–588, 2011.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Milk Utilized in Small-Scale Artisan Cheese Production. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 8, p. 1353–1358, ago. 2011.

DARBOE, S.; DOBRENIECKI, S.; JARJU, S.; JALLOW, M.; MOHAMMED, N. I.; WATHUO, M.; CEESAY, B.; TWEED, S.; ROY, R. B.; OKOMO, U.; KWAMBANA-ADAMS, B.; ANTONIO, M.; BRADBURY, R. S.; DE SILVA, T. I.; FORREST, K.; ROCA, A.; LAWAL, B. J.; NWAKANMA, D.; SECKA, O. Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical *Staphylococcus aureus* in an Urban Gambian Hospital: A 11-year period retrospective pilot study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2019.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

DAS DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; DA NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. de L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**, 2013.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, 2010. .

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. **The evolution of *Staphylococcus aureus*** *Infection, Genetics and Evolution*, 2008. .

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

DIAS, R. V. da C. Principais métodos de controle e diagnósticos de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 23–27, 2007.

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

DITTMANN, K. K.; CHAUL, L. T.; LEE, S. H. I.; CORASSIN, C. H.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; GRAM, L.; OXARAN, V. *Staphylococcus aureus* in some Brazilian dairy industries: Changes of contamination and diversity. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

DO CARMO, S.; SOUZA, R. D.; LINARDI, R. V.; DE SENA, J. M.; DOS SANTOS, A. D.; DE FARIA, E. M.; PENA, C. E.; MARTI, J.; HENEINE, G. L. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9–14, fev. 2002.

DORES, M. T. das. Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração. p. 91, 2007.

DORES, M. T. das; FERREIRA, C. L. de L. F. Queijo Minas Artesanal, Tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 26–34, 2012.

DUFOUR, P.; JARRAUD, S.; VANDENESCH, F.; NOVICK, R. P.; BES, M.; LINA, G.; ETIENNE, J. High Genetic Variability of the agr Locus in *Staphylococcus* Species High Genetic Variability of the agr Locus in *Staphylococcus* Species. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1180–1186, 2002.

EMBRAPA. **Anuario do leite de 2019**. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em: 18 jan. 2021.

EMATER. **Dia Mundial do Queijo**. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-queijo/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26194. Acesso em: 28 jan. 2022.

FALUGI, F.; KIM, H. K.; MISSIAKAS, D. M. Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses. **mBio**, v. 4, n. 5, p. 1–9, 2013.

FETSCH, A.; CONTZEN, M.; HARTELT, K.; KLEISER, A.; MAASSEN, S.; RAU, J. Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, 187 (2014), pp. 1-6

FERREIRA, M. A.; BERNARDO, L. G.; NEVES, L. S.; CAMPOS, M. R. H.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRÉ, M. C. P. Virulence profile and genetic variability of Staphylococcus aureus isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8589–8597, 2016.

FIERN. **O Brasil que a gente produz – Indústria de Queijos**. Disponível em: <https://www.fiern.org.br/o-brasil-que-gente-produz-queijos/#>. Acesso em: 28 fev. 2022.

FIGUEIREDO, S. P.; BOARI, C. A.; DE SOUZA COSTA SOBRINHO, P.; DÓRIA CHAVES, A. C. S.; DA SILVA, R. B.; SILVA CORREIO, H. B. F. Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, 2015.

FIGUEIROA, M.; DE FREITAS, L.; LUZ, S.; WILTON, J.; JÚNIOR, P.; ANGÉLICA, D.; DUARTE, M.; MERCIA, A.; VASCONCELOS, M.; RIBEIRO, A. R.; MOTA, R. A.; CRISTINA, T.; BALBINO, L.; LÚCIA, T.; STAMFORD, M. Detecção de genes toxigênicos em amostras de Staphylococcus spp . isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 375–379, 2009.

FINGER, J. A. F. F.; BARONI, W. S. G. V; MAFFEI, D. F.; BASTOS, D. H. M.; PINTO, U. M. Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 434, 23 set. 2019.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMYTH, C. J. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine Staphylococcus aureus Encoding Multiple Superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 63–70, 1 jan. 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. In: ATHENEU (Ed.). 3. ed. [s.l: s.n.]p. 196.

GHASEMIAN, A.; NAJAR PEERAYEH, S.; BAKHSHI, B.; MIRZAEI, M. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus from Hospitalized Children. **Iranian journal of pathology**, v. 10, n. 4, p. 258–64, 2015.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 289–309, 2014.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; ASPIROZ, C.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M. Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2010a.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, R.; ASPIROZ, C.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2010b.

GOR, V.; TAKEMURA, A. J.; NISHITANI, M.; HIGASHIDE, M.; ROMERO, V. M.; OHNIWA, R. L.; MORIKAWA, K. Finding of agr phase variants in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, 2019.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. S5, p. S350–S359, jun. 2008.

GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583–592, jan. 2014.

HARMSSEN, D.; CLAUS, H.; WITTE, W.; ROTHGÄNGER, J.; CLAUS, H.; TURNWALD, D.; VOGEL, U. 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**, 2003.

HASHEMIZADEH, Z.; HADI, N.; MOHEBI, S.; KALANTAR-NEYESTANAKI, D.; BAZARGANI, A. Characterization of SCCmec, spa types and Multi Drug Resistant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among inpatients and outpatients in a referral hospital in Shiraz, Iran. **BMC Research Notes**, 2019.

HAVERI, M.; ROSLÖF, A.; RANTALA, L.; PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 993–1000, 2007.

HE, Y.; XIE, Y.; REED, S. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates. In: **Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols**. 2. ed. [s.l.: s.n.]p. 103–111.

HOLZINGER, D.; GIELDON, L.; MYSORE, V.; NIPPE, N.; TAXMAN, D. J.; DUNCAN, J. A.; BROGLIE, P. M.; MARKETON, K.; AUSTERMANN, J.; VOGL, T.; FOELL, D.; NIEMANN, S.; PETERS, G.; ROTH, J.; LOFFLER, B. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 5, p. 1069–1081, 2012.

HOSOSAKA, Y.; HANAKI, H.; ENDO, H.; SUZUKI, Y.; NAGASAWA, Z.; OTSUKA, Y.; NAKAE, T.; SUNAKAWA, K. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: A new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 79–86, 2007.

IGBINOSA, E. O.; BESHIRU, A.; AKPOREHE, L. U.; OVIASOGIE, F. E.; IGBINOSA, O. O. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: Implications for public health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2016.

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

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBØ, R.; SUNDE, E. B.; SKJERVHEIM, M. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 492–496, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.017>>.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383–388, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.013>>.

JARDIM, J. G.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; LIMA, G. R. S. Melhoramento genético visando à resistência a mastite em bovinos leiteiros. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 199, 2014.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUGUENIN, M.-C.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 2944–2948, maio 2015.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; HØGÅSEN, H. R.; RØRVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 158–166, jul. 2005.

JÚNIOR C. G., L. C.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES RESPLANDE, F. A.; COSTA BUENO, RENATA GOLIN CAMPOS RESENDE, ELIANE CARVALHO ALMEIDA, K. B. Maturação do queijo minas artesanal da microrregião campo das vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. v. 69, n 2, p. 111–120, 2014.

JUNG HR, LEE YJ. Characterization of Virulence Factors in Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bulk Tank Milk. **Animals (Basel)**. Jan 26;12(3):301, 2022.

KHAIRALLA, A. S.; WASFI, R.; ASHOUR, H. M. Carriage frequency,

phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dental health-care personnel, patients, and environment. **Scientific Reports**, 2017.

KHORAMIAN, B.; JABALAMELI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 73–77, nov. 2015.

KHORAMROOZ, S. S.; ALIPOOR DOLATABAD, S.; MOSTAFAPOUR DOLATABAD, F.; MARASHIFARD, M.; MIRZAI, M.; DABIRI, H.; HADDADI, A.; RABANI, S. M. R.; GHAFARIAN SHIRAZI, H. R.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Detection of tetracycline resistance genes, aminoglycoside modifying enzymes, and coagulase gene typing of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in the southwest of Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 2017.

KLOMPAS, M.; MD; MPH; FRCPC. Toxic Shock Syndromes. In: **Decision Making in Medicine**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 336–337.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, 2016. .

KOREEN, L.; GRAVISS, S. V.; RAMASWAMY, E. A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B. N. Typing Method for Discriminating among. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 792–799, 2004.

KRAKAUER, T. Staphylococcal superantigens: Pyrogenic toxins induce toxic shock. **Toxins**, 2019. .

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet (London, England)**, v. 357, n. 9264, p. 1225–40, 2001.

LAMPUGNANI, C.; TAÍS, M.; MONTANHINI, M.; EMILENE, M.; CAMPOS, M.; NERO, L. A.; BERSOT, S. Acta Scientiarum Enterotoxins production, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from refrigerated raw cow milk. p. 1–9, 2019.

LARSEN, H. D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N. H. R.; JENSEN, N. E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, 2000.

LARSEN, J.; STEGGER, M.; ANDERSEN, P.S.; PETERSEN, A.; LARSEN, A.R.;

WESTH H. Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, 63, pp. 1349-1352, 15 nov. 2016.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266–272, fev. 2009.

LIMA, E. M. F.; QUECAN, B. X. V.; CUNHA, L. R.; FRANCO, B. D. G. M.; PINTO, U. M. Cell-Cell Communication in Lactic Acid Bacteria: Potential Mechanisms. In: **Marcela A. C. de Albuquerque; Alejandra de Moreno de LeBlanc; Jean Guy Joseph LeBlanc; Raquel Bedani Salvio. (Org.). Lactid Acid Bacteria: A Functional Approach**. 1ed. ed. LONDON: CRC PRESS, p. 1–14. 2020.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus* : superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 378–385, ago. 2004.

LÚCIO, É. C.; ALBUQUERQUE, M. S.; OLIVEIRA, J. M. B.; GOUVEIA, G. V.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. Ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite de vacas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 30 jul. 2018.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516–521, 2004.

MARTIN-LOPEZ, J. V.; PEREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTIN, F.; DIEZ GIL, O.; BATISTA, N.; MORALES, M.; MENDEZ-ALVAREZ, S. Detection of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Harboring the *ica* Gene Cluster Needed for Biofilm Establishment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1569–1570, 1 abr. 2002.

MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219–230, maio 2015.

MAZMANIAN, S. K.; TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1049–1057, jun. 2001.

MCDUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003.

MIAO, J.; LIN, S.; SOTEYOME, T.; PETERS, B. M.; LI, Y.; CHEN, H.; SU, J.;

LI, L.; LI, B.; XU, Z.; SHIRTLIFF, M. E.; HARRO, J. M. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under Food Heat Processing Conditions: First Report on CML Production within Biofilm. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1312, 4 dez. 2019.

MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Disões sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2012. Diário do Executivo, p. 1.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 1.305. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 30 abr.2013.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº1969, de 26 de março de 2020. Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal - QMA em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal - QMA .Belo Horizonte, 26 de mar. 2020.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 2.05 de 07 de abril de 2021 - MG - Altera a Portaria IMA nº 1.969/2020, que dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal (QMA) em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal (QMA), Belo Horizonte, 07 abr. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. G. D. M. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE 7 DE AGOSTO DE 2013**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_24684623_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_7_D E_AGOSTO_DE_2013.aspx>. Acesso em: 8 nov. 2017.

MINISTERIO DA SAÚDE. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil Informe 2018. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2022. Disponível em: (http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_a limentos.pdf).

MONECKE, S.; MÜLLER, E.; BÜCHLER, J.; STIEBER, B.; EHRLICH, R. *Staphylococcus aureus* in vitro secretion of alpha toxin (hla) correlates with the affiliation to clonal complexes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MURRAY, R. J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. SUPPL. 2, p. 106–119, 2005.

NAKAMURA, Y.; OSCHERWITZ, J.; CEASE, K. B.; CHAN, S. M.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; HASEGAWA, M.; VILLARUZ, A. E.; CHEUNG, G. Y. C.; MCGAVIN, M. J.; TRAVERS, J. B.; OTTO, M.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 397–401, 30 nov. 2013.

NAM, H. M.; LEE, A. L.; JUNG, S. C.; KIM, M. N.; JANG, G. C.; WEE, S. H.; LIM, S. K. Antimicrobial susceptibility of *staphylococcus aureus* and characterization

of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2011.

NAWROTEK, P.; BORKOWSKI, J.; BORÓN-KACZMARSKA, A.; FUROWICZ, A. J. The characteristics of staphylococcal enterotoxins produced by strains isolated from mastitic cows, including epidemiological aspects. **Przeegląd epidemiology** 2005.

NERO, L. A.; NOGUEIRA, G. Análises Moleculares Para Avaliação Do Potencial Entero-Toxigênico De *Staphylococcus Aureus* Isolados De Leite E Queijo. **IV Simpósio Nacional de Bovinocultura de Leite**, 2007. Disponível em: <<http://www.simleite.com/arquivosAnais/arquivo67>>.

NÓBREGA, J. E. Caracterização Do Fermento Endógeno Utilizado Na Fabricação Do Queijo Canastra No Município De Medeiros , Minas. p. 82, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, 2005.

O'HALLORAN, D. P.; WYNNE, K.; GEOGHEGAN, J. A. Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1598–1609, 2015.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D. A.; O'GARA, J. P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1379–1388, 2007.

OMS. **Organización Mundial de la Salud**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

ORNELAS, E. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SILVA, M. C. C.; DIAS, R. S. Perfil Enterotoxigênico de Amostras de Queijo Minas Artesanal Produzidas na Serra da Canastra-MG. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 2, n. 4, p. 7–11, 31 dez. 2012.

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

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, p. 32–37, fev. 2014.

PARUSSOLO, L.; ANTÔNIO, R.; SFACIOTTE, P.; DALMINA, K. A.; MELO, F.

D.; MACIEL, U.; FERRAZ, S. M. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. *Detecção de genes de virulência e perfis de resistência antimicrobiana de Escherichia coli* isoladas de le. p. 163–178, 2019.

PERIN, L. M.; SAVO SARDARO, M. L.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, ago. 2017.

PINTO, M.; FERREIRA, C.; MARTINS, J.; TEODORO, V.; PIRES, A.; FONTES, L.; VARGAS, P. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do serro, minas gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009.

PINTO, M. S. Diagnóstico Socioeconômico , Cultural E Avaliação Dos Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos. p. 151, 2004.

PINEDA A.P.A.; CAMPOS G.Z.; PIMENTEL-FILHO N.J.; FRANCO B.D.G.M.; PINTO U.M. Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers of Microbiology**. 2021

QIAN, W.; SHEN, L.; LI, X.; WANG, T.; LIU, M.; WANG, W.; FU, Y.; ZENG, Q. Epidemiological characteristics of *Staphylococcus Aureus* in raw goat milk in Shaanxi Province, China. **Antibiotics**, 2019.

QUAVE, C. L. Flipping the switch : Tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Flipping the switch : tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence*. n. August 2015, 2014.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J. R.; WATTS, J. L.; KOOP, G.; MIDDLETON, J. R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2018.

REGASA, S.; MENGISTU, S.; ABRAHA, A. Milk Safety Assessment, Isolation, and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Farms of Mukaturi and Sululta Town, Oromia Region, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**, 2019.

RIBOT, E. M.; FREEMAN, M.; HISE, K. B.; GERNER-SMIDT, P. PulseNet: Entering the Age of Next-Generation Sequencing. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 7, p. 451–456, jul. 2019.

RODRIGUES, M. X.; CRISTINA, N. C. C.; TREVILIN J. et al. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. **J Dairy Sci**. 100(7):5167-5175, 2017.

RÖDSTRÖM, K. Structural Basis of Immune Receptor Binding by

Staphylococcal Superantigens. **Lund University, Faculty of Medicine Doctoral Dissertation Series**, 2014. .

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; DE SOUZA, M. L. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saude Publica**, v. 22, n. 5, p. 458–461, 1988.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Hig. Aliment**, v. 8, n. 33, p. 22–23, 1994.

SANT'ANNA, F. M.; CARVALHO, I. S.; FERREIRA, F. S.; ACURIO, L. B. Microbiological Quality of Minas Artisanal Cheeses from Certified Properties at Serra da Canastra Region, Minas Gerais, Brazil in 2016. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 2016–2018, 21 maio 2018.

SAKR, A.; BRÉGEON, F.; MÈGE, J.-L.; ROLAIN, J.-M.; BLIN, O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 8 out. 2018.

SANTOS, D. M.; CUTRIM, B. D. S.; OLIVEIRA, P. V. de; SAMINEZ, W. F. D. S.; CARVALHO JUNIOR, A. R.; DINIZ, R. M.; PEREIRA, J. S.; CALLOU, M. J. A.; DA SILVA, L. C. N. Novas abordagens experimentais para o combate de infecções causadas por *staphylococcus aureus*. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 10, n. 1, p. 92, 31 jul. 2018.

SANTOS, A. L. dos; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. de; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SANTOS, F. G. B. Estudo epidemiológico-molecular e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos Estados de São Paulo e Pernambuco. 2009. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

SEBRAE. Indicações geográficas Brasileiras. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas 5ª edição**, p. 49 a 53, 2016. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae>>.

SENA, M. J. de. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. 2000. **Universidade Federal de Minas Gerais**, UFMG, 2000.

SHARMA, V.; SHARMA, S.; DAHIYA, D. K.; KHAN, A.; MATHUR, M.; SHARMA, A. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in

North West India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 65, 20 dez. 2017.

SHIROMA, A.; TERABAYASHI, Y.; NAKANO, K.; SHIMOJI, M.; TAMOTSU, H.; ASHIMINE, N.; OHKI, S.; SHINZATO, M.; TERUYA, K.; SATOU, K.; HIRANO, T. First Complete Genome Sequences of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach 1884 (DSM 20231 T), Determined by PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. 4–5, 27 ago. 2015.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA, G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ, J.; KREISWIRTH, B. N. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003.

SILVA GUIMARÃES, J. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal da Canastra**. 2007. Lavras: UFLA. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), 2007.

SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM ALIMENTOS. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, 2017.

SILVA, E. R.; SILVA, T. R. M.; PEREIRA, A. M. G.; MACHADO, A. C.; SANTORO, K. R. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2012.

SILVA, N.; AMSTALDEN, CHRISTINA VALÉRIA FERRAZ DE ARRUDA, N.; HIROMI TANIWAKI, M.; ABEILAR ROMEIRO, R.; MIDORI OKAZAKI, M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. 5ta edição ed. [s.l.] Blucher, 2017.

SOUZA, V.; MELO, P. C.; MEDEIROS, M. I. M.; CONDE, S. O.; NADER FILHO, A. Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal da Araxá. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 19, 22 dez. 2015.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, abr. 2000.

TALLENT, S. M.; BENNETT, R. W.; HAIT, J. M. **BAM 13B - Staphylococcal Enterotoxins Detection Methods**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-13b-staphylococcal-enterotoxins-detection-methods>>. Acesso em: 14 out. 2019.

TAN, L.; LI, S. R.; JIANG, B.; HU, X. M.; LI, S. Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. v. 9, n. January, p. 1–11, 2018.

TAREKGNE, E. K.; SKJERDAL, T.; SKEIE, S.; RUDI, K.; PORCELLATO, D.; FÉLIX, B.; NARVHUS, J. A. Enterotoxin gene profile and molecular characterization of staphylococcus aureus isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray Region, Northern Ethiopia. **Journal of Food Protection**, 2016.

TAVAKOL, M.; RIEKERINK, R. G. O.; SAMPIMON, O. C.; VAN WAMEL, W. J. B.; VAN BELKUM, A.; LAM, T. J. G. M. Bovine-associated MRSA ST398 in The Netherlands. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 28, 1 dez. 2012.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 1995. .

THIRAN, E.; DI CICCIO, P. A.; GRABER, H. U.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; HUMMERJOHANN, J. Biofilm formation of Staphylococcus aureus dairy isolates representing different genotypes. **Journal of Dairy Science**, 2018.

THOMPSON, T. A.; BROWN, P. D. Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in Staphylococcus aureus using a Caenorhabditis elegans model. **International Journal of Infectious Diseases**, 2017.

TODD, J.; FISHAUT, M.; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. **The Lancet**, v. 312, n. 8100, p. 1116–1118, nov. 1978.

TONDO, E. C.; GUIMARÃES, M. C. M.; HENRIQUES, J. A. P.; AYUB, M. A. Z. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by Staphylococcus aureus using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, 2000.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, 2015.

TORRES, G.; VARGAS, K.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.; REYES-VELEZ, J.; OLIVERA-ANGEL, M. Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02535, out. 2019.

TRABER, K. E.; LEE, E.; BENSON, S.; CORRIGAN, R.; CANTERA, M.; SHOPSIN, B.; NOVICK, R. P. agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates. **Microbiology**, v. 154, n. 8, p. 2265–2274, 1 ago. 2008.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003.

TUFFS, S.; HAERYFAR, S.; MCCORMICK, J. Manipulation of Innate and

Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 53, 29 maio 2018.

TÜRKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Milk. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 3, p. 197–203, maio 2010.

VAN CAUTEREN, D.; LE STRAT, Y.; SOMMEN, C.; BRUYAND, M.; TOURDJMAN, M.; DA SILVA, N. J.; COUTURIER, E.; FOURNET, N.; DE VALK, H.; DESENCLOS, J.-C. Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen–Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p. 1486–1492, set. 2017.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N.; BEAUJEAN, D.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J. Emergence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus of Animal Origin in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1834–1839, dez. 2007.

VANETTI, M. C. .; PINTO, U. M. Bactérias patogênicas em leite e produtos lácteos. In: **Qualidade microbiológica do leite cru**. 1ed. ed. Visconde do Rio Branco - MG: Suprema, 2013. p. 181–206.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179–185, 2003.

VAZQUEZ, V.; LIANG, X.; HORNDAHL, J. K.; GANESH, V. K.; SMEDS, E.; FOSTER, T. J.; HOOK, M. Fibrinogen Is a Ligand for the Staphylococcus aureus Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) Bone Sialoprotein-binding Protein (Bbp). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29797–29805, 26 ago. 2011.

VIEGAS, S. C.; MIL-HOMENS, D.; FIALHO, A. M.; ARRAIANO, C. M. The virulence of salmonella enterica serovar typhimurium in the insect model galleria mellonella is impaired by mutations in RNase E and RNase III. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6124–6133, 2013.

VIEIRA P, K.; MENDES M, M.; ROSA MORENO, C.; HASSEGAWA HIROKO, R. Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **ConScientiae Saúde**, v. 7, n. 2, p. 201–206, 2008.

VIVAS, M.; GUTIERREZ, A. Typification Methods and Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus with Methicillin Resistance. In: **Staphylococcus Aureus**. [s.l.] IntechOpen, 2019. p. 13.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences, v. 99, n. 15, p. 10102–10107, 23 jul. 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.152152499>>.

YAN X.; WANG, B.; TAO, X.; HU, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China **Applied and Environmental Microbiology**, 78 (2012), pp. 6637-6642

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1 – Origem das cepas controle

Origem	Genes presentes	Cedida por:
NCO2	<i>seb, sek, seq</i>	Professora doutora Nathalia Cirone
NCO3	<i>sem, sen, seo, hla, hlb, hld, hlg, hlg-v, tst, agrII, pvl, mec A, mec A compl A, ica, AD,</i>	
NCO4	<i>agrIII</i>	
NCO6	<i>sej</i>	
NCO7	<i>agrI, mecA compl B, scc mecl</i>	
NCO11	<i>clfB, fnbB</i>	
NCO13	<i>sed, seg, seh, ebps, fnbA,</i>	
NC16	<i>sea</i>	
NCO18	<i>pvl, bbp, eno, fib, clfA</i>	
NC21	<i>see</i>	
NCO25	<i>sec, sel</i>	
NC26	<i>bap</i>	
NC27	<i>icaA, icaD</i>	
ATCC 13565	<i>sea</i>	
	<i>seb</i>	

ATCC 14458	
ATCC 19095	<i>sec</i>
ATCC 23235	<i>sed</i>
ATCC 27664	<i>see</i>

8.2. Anexo 2 - Publicação do artigo de Revisão

Pineda A.P.A.; Campos G.Z.; Pimentel-Filho N.J.; Franco B.D.G.M.; Pinto U.M. (2021). Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers in Microbiology**. 12:666922.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.666922>