

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**Fatores de patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil**

**RENATA DIAS DE CASTRO**

**BELO HORIZONTE - MG  
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
2019**

**Renata Dias de Castro**

**Fatores de patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadores: Simone Gonçalves dos Santos e Alvaro Cantini Nunes

**BELO HORIZONTE - MG  
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
2019**

Castro, Renata Dias de, 1989.

C355f Fatores de patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo minas artesanal da região de Campos das Vertentes, Brasil. / Renata Dias de Castro – 2019.

126p.: il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Coorientadores: Álvaro Cantini Nunes

Simone Gonçalves dos Santos

Tese de Doutorado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Leite– Análise -Teses - 2- Bactéria – *Staphylococcus aureus* - Teses – 3 – Queijo – Análise - Teses  
I– Sousa, Marcelo Resende de - II – Nunes, Álvaro Cantini– III – Santos, Simone Gonçalves dos – IV -  
Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. V- Título.

**CDD – 637.1**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

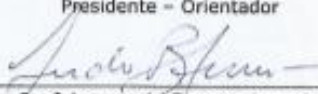
### RENATA DIAS DE CASTRO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.


Aprovada em 15 de Abril de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



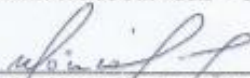
Prof. Marcelo Resende de Souza  
Presidente - Orientador



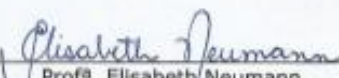
Prof. Leonardo Borges Acurcio  
Centro Universitário de Formiga - UNIFOR-MG



Prof. Fernando Nogueira de Souza  
Universidade de São Paulo - USP



Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Elisabeth Neumann  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB- UFMG





## **Agradecimentos**

Agradeço à Divindade Superior, por ser o guia maior da minha vida.

À minha mãe Delma, por ser meu maior exemplo de mulher, de força, de sabedoria e de amor. Por ser a pessoa que melhor me conhece. Por ser meu recanto de paz e renovação.

Ao meu pai Adevaldo, por ser um grande incentivador do meu estudo. Por ter me ensinado desde pequena que eu não precisava ser a melhor aluna de uma classe. Mas, sim, que eu fosse atrás de vencer os meus desafios internos. Se hoje estou aqui, pai, é porque você me fez acreditar que eu sou sempre capaz.

À minha irmã Vanessa, que como irmã mais velha sempre assumiu o papel daquela que cuida, protege e incentiva. Obrigada pela vibração tão sincera de cada passo que eu dou, irmã.

Ao meu irmão Ricardo, por sempre “sacudir” o meu mundo e me tornar um ser capaz de desconstruir, reinventar e ressignificar ideias, sentidos e atitudes. Você transforma o meu olhar, irmão.

Ao meu marido Thiago, por ser um grande incentivador de tudo o que eu faço. Obrigada por me acolher quando eu precisava, por me puxar à realidade quando eu me desprendia dela e por me lembrar a todo instante da força interna que eu tinha para alcançar os meus objetivos.

À Escola de Veterinária da UFMG, por ter me acolhido por tantos anos e propiciar a minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu orientador Marcelo Resende, agradeço por todos os ensinamentos desde a graduação e por despertar em mim o amor pela área de tecnologia e inspeção de produtos de origem animal. Obrigada por ser um orientador tão presente, técnico e compreensivo. Agradeço a amizade e por todas as orientações valiosas durante este período.

Aos meus co-orientadores, Simone Gonçalves e Álvaro Cantini, por todo o apoio e suporte dado na execução deste trabalho.

Aos produtores de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, por gentilmente terem nos recebido em suas queijarias, pela prosa, pelo cafezinho da tarde e pela contribuição na execução deste projeto.

À banca examinadora (Mônica Pinho, Elisabeth Neumann, Leonardo Acurcio e Fernando Souza) pelas sugestões e críticas que pontencializaram o trabalho da nossa equipe.

Aos professores do DTIPOA, pela participação na minha formação e disponibilidade sempre que preciso.

À Silvinha por ter me orientado e por ter compartilhado gentilmente comigo seus saberes, seus materiais, suas amostras, seu tempo e seu bom humor contagiante. Os dias de experimento ao seu lado sempre foram os mais leves, produtivos e divertidos!

Ao jovem Sávio, pela paciência, pela trilha sonora no laboratório e pelos ensinamentos na área da biologia molecular. Obrigada por sempre acreditar que bons resultados viriam. Escutar o seu “calma, jovem, desse jeito vai dá certo” era o meu conforto nos dias difíceis de experimento.

Ao Rafinha e ao Fernando Souza por serem meus exemplos de inteligência científica e por terem idealizados junto comigo pontos importantes deste projeto.

Aos meus amigos de laboratório, em especial, ao Cosme, Giva, Gabi, Letícia, Livia, Felipe, Leonardo, Naiara e Ranier, pelas trocas, pelos conhecimentos, pelos desafios da pós-graduação e pelos risos compartilhados.

Ao Antônio Filho do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo por me ensinar e executar gentilmente parte da metodologia molecular do meu experimento.

Aos professores Robledo Filho (Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa), Henrique Figueiredo (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais) e Marcos Bryan (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo) por possibilitarem a execução de parte metodológica deste trabalho e pelo apoio técnico-científico.

Ao Ricardo Dias e Kelly Luiz da Fundação Ezequiel Dias (LACEN/MG) pela parceria no trabalho

Aos técnicos e amigos de laboratório do DTIPOA Maura Regina de Almeida Moura (Maurinha), Marco Antônio Guerra e César Victor Brandão Araújo por toda colaboração dada.

Ao Milton Luiz de Jesus (Miltinho), pela disposição em me ajudar sempre que preciso.

Aos meus amigos Guilherme Picinin, Isabela Lanza, Guilherme Resende, Breno Curty, Renan Neto, Luiz Eduardo, Livia Maria, Karina Roque, Samuel Dias, Baltazar Ruas, Amanda Mendes, João Lucas, Diogo Carvalho, Arthur Pizani e tantos outros por torcerem por mim e por trazerem tanta vibração boa à minha vida!

Ao Radar, Luka, Maya, Apollo, Noturno, Viola e a todos os outros companheirinhos que tive o prazer de conviver, por preencherem a minha vida com seu amor puro e fiel.

À FAPEMIG e à FAPESP pelo apoio financeiro do projeto e ao Cnpq pela concessão da bolsa.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b>	<b>10</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1.	Objetivo geral	20
2.2.	Objetivos específicos	20
 Capítulo 1 <b>Caracterização microbiológica, fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos de <i>Staphylococcus aureus</i> associados às intoxicações alimentares: Revisão de Literatura</b>		<b>21</b>
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.	Caracterização microbiológica de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.1.	Fenotípica	23
2.2.	Genotípica	25
3.	Intoxicação alimentar estafilocócica	29
3.1.	Fatores de patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> associados a Intoxicação alimentar estafilocócica	31
3.1.1.	Papel das enterotoxinas estafilocócicas nas intoxicações alimentares	32
3.1.1.1	Características gerais das enterotoxinas estafilocócicas	32
3.1.1.2	Mecanismos de ação das enterotoxinas estafilocócicas	35
3.1.1.3	Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigênicos e de suas enterotoxinas em leites e derivados	36
3.1.2	Papel do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> nas matrizes alimentares	39
3.1.3	Papel do mecanismo de adaptação de <i>Staphylococcus aureus</i> nas matrizes alimentares	43
3.2.	Surtos de intoxicação estafilocócica atribuídos ao consumo de leite e derivados	49
4.	Resistência antimicrobiana	52
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>
 Capítulo 2 <b>Fatores de patogenicidade e perfil de resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil</b>		<b>66</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>67</b>
2.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>69</b>
2.1	Amostragem	69
2.2.	Caracterização fenotípica e identificação das amostras por MALDI- TOF MS	69
2.3.	Deteção de genes de patogenicidade por PCR convencional	69
2.4.	Avaliação da expressão dos genes codificadores da produção das EE e TSST por qRT- PCR	70
2.5.	Produção <i>in vitro</i> de biofilme	72
2.6.	Produção <i>in vitro</i> de toxinas	72
2.7.	Produção <i>in vitro</i> de hemolisina	73
2.8.	Teste de resistência aos antimicrobianos	73
2.9.	Análise hierárquica de <i>clusters</i> , teste qui-quadrado e análise de correspondência	74
3.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
3.1.	Caracterização fenotípica e identificação de espécie das amostras	75
3.2.	Produção de biofilme	75
3.3.	Deteção dos genes codificadores de toxinas estafilocócicas	77
3.4.	Expressão dos genes codificadores de toxinas estafilocócicas	79



3.5.	Produção <i>in vitro</i> de toxinas estafilocócicas	81
3.6.	Produção <i>in vitro</i> de hemolisina	81
3.7.	Deteção do gene <i>agr</i> (Sistema de <i>Quorum sensing</i> )	82
3.8.	Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras	83
3.9.	Análise hierárquica de <i>cluster</i>	84
4.	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>87</b>
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>87</b>

**Capítulo 3      Diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil** **94**

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>95</b>
2.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>97</b>
2.1	Extração de DNA	97
2.2.	Identificação molecular das amostras	98
2.3.	Tipificação pelo método de amplificação e sequenciamento do <i>spa</i>	98
2.4.	Tipificação pela técnica de <i>rep-PCR</i>	99
2.5.	Tipificação proteômica	99
2.6.	Concordância	99
2.7.	Poder discriminatório	100
2.8.	Tipabilidade	100
3.	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>100</b>
3.1.	Identificação genética das amostras	100
3.2.	Tipificação pelo método de amplificação e sequenciamento do <i>spa</i>	101
3.3.	<i>Spa x (GTG)<sub>5</sub></i> - Poder discriminatório, concordância e tipabilidade	106
3.4.	<i>Spa x</i> MalDI TOF MS- Poder discriminatório, concordância e tipabilidade	109
3.5.	<i>(GTG)<sub>5</sub> x</i> MALDI-TOF MS - Poder discriminatório, concordância e tipabilidade	113
4.	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>115</b>
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>115</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

---

**Capítulo 2**

Tabela 1 -	Marcadores e concentração de primers da qRT-PCR utilizados para as reações	71
Tabela 2.	Perfil de <i>clusters</i> baseado em características fenotípicas (capacidade de fermentação de DNase e manitol), produção de toxinas (Enterotoxinas A, C, TSST e OSP), atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (Oxacilina, Eritromicina, Penicilina e Tetraciclina)	84

**Capítulo 3**

Tabela 1 -	Tipabilidade, nível de classificação, poder discriminatório e concordância dos métodos de tipificação ( <i>GTG<sub>5</sub></i> , <i>spa typing</i> e MALDI TOF- MS) aplicados nas amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>	106
------------	--	-----

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### Capítulo 1

- Figura 1 - Sistema de *quorum sensing* *Agr.* 45  
Figura 2 - Esquema da complexa rede de interações que determinam a formação e a ruptura do biofilme. 49

### Capítulo 2

- Figura 1 - Nível de expressão de *sea*, *tsst-1* e *sec* pelas amostras de *Staphylococcus aureus*. 79  
Figura 2 - Mapa perceptivo da análise de correspondência entre atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (eritromicina, penicilina e tetraciclina) e os *clusters*. 86

### Capítulo 3

- Figura 1 - Gel com as bandas específicas compatíveis com *Staphylococcus aureus* (359 pb- gene *nuc* e 228 pb- gene *16S rRNA*). *Ladder* de 100 bp 101  
Figura 2 - Resultado da amplificação da região X do gene da proteína A. *Ladder* de 100pb. 101  
Figura 3- Dendrograma das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de sequenciamento do gene *spa* com os respectivos dados de genótipo 102  
Figura 4 - Dendrograma das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de *rep-PCR*. 108  
Figura 5 - Dendrograma (MSP) das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de MALDI-TOF MS considerando o nível de distância arbitrário de 250 111

---

## LISTA DE QUADROS

---

### Capítulo 1

- Quadro 1 - Características das enterotoxinas estafilocócicas 34

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

### Capítulo 3

- Gráfico 1. *Minimal spanning tree* (MST) de 74 amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas por *spa typing* de acordo com os genótipos identificados 103

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes patogênicos encontrados em queijos produzidos com leite cru no mundo, incluindo o queijo Minas artesanal produzido no Brasil. No entanto, informações sobre *S. aureus* isolados de queijos artesanais e de fontes de produção em queijarias de pequena escala são muito limitadas. Nós objetivamos caracterizar os aspectos de patogenicidade e a diversidade clonal de *S. aureus* isolados de queijo Minas artesanal, leite cru, soro-fermento e manipuladores da Região de Campo das Vertentes, MG, Brasil. As amostras foram identificadas usando MALDI-TOF MS e para a avaliação de produção de biofilme o Agar Vermelho Congo (AVC) e placas de poliestireno. PCR foi utilizada para detectar *icaA*, *icaB*, *icaC*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst-1*, *agr* e *mecA*. A expressão dos genes das toxinas estafilocócicas em amostras positivas na PCR foi avaliada por qRT-PCR e a produção dessas toxinas bem como a atividade hemolítica foram avaliadas *in vitro*. Também avaliamos o perfil de resistência antimicrobiana das amostras. Para análises estatísticas foram utilizados cluster, teste qui-quadrado e correspondência. O estudo da diversidade clonal das amostras foi realizado pela aplicação das técnicas de *spa typing*, *rep-PCR ((GTG)<sub>5</sub>* e MALDI-TOF MS, sendo realizada a avaliação do poder discriminatório, da tipabilidade e da concordância entre as técnicas de tipificação supramencionadas. Foram analisadas 76 amostras de *Staphylococcus aureus*. Na PCR, 18,42%, 18,42%, 2,63% e 77,63% das amostras foram positivos para *sea*, *tsst-1*, *sec* e *agr*, respectivamente. Os genes das toxinas estafilocócicas foram de baixa expressão na qRT-PCR e apenas duas amostras foram produtoras de TSST. A maior parte das amostras (61,84%) apresentou atividade hemolítica e foram formadoras de biofilme em CRA (69,73%) e em placas de poliestireno (81,58%). Nenhuma das amostras possuía *mecA* nem apresentou padrão de multirresistência, sendo as maiores resistências observadas para Penicilina G (67,11%) e Tetraciclina (27,63%). O genótipo de maior frequência no estudo foi o t605 (27%), seguido pelos tipos t002 (10,8%) e t521 (9,5%). *Spa typing* e *(GTG)<sub>5</sub>* apresentaram alto poder discriminatório, em contrapartida ao MALDI-TOF MS que apresentou baixo poder discriminatório e baixa concordância com as técnicas genômicas de tipificação. Em conclusão, as amostras apresentaram

potencial toxigênico, com maior prevalência de *sea* e *tsst-1*. Nós constatamos que a produção de biofilme foi o principal fator de patogenicidade das amostras. Foram formados seis clusters cujas frequências de distribuição diferiram para atividade hemolítica, formação de biofilme (análises qualitativa e quantitativa) e resistência à Penicilina, Tetracilina e Eritromicina ( $P < 0,05$ ). As amostras de *Staphylococcus aureus* apresentaram alta diversidade genética, e há indícios de que a presença desse micro-organismo no produto final seja fruto da contaminação cruzada do leite cru, do soro-fermento (pingo) e dos manipuladores assintomáticos desse agente bacteriano. Nossos achados enfatizam a necessidade de medidas efetivas que previnam a intoxicação alimentar estafilocócica, limitando o crescimento de *S. aureus* e a formação de enterotoxinas, bem como reforçam a importância da implementação das boas práticas de fabricação para reduzir o risco de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas ao longo da cadeia de produção do queijo Minas artesanal.

**Palavras chave:** *Staphylococcus aureus*, toxinas, biofilme, expressão gênica, *quorum sensing*, diversidade clonal

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens found in cheeses produced with raw milk, including Minas artisanal cheese from Brazil. However, information on *S. aureus* isolated from artisanal cheeses and its sources of production in small-scale dairies is very limited. We aimed to characterize the virulence aspects and clonal diversity of *S. aureus* isolated from Minas artisanal cheese, raw milk, endogenous starter culture and handlers from the region of *Campo das Vertentes*, Minas Gerais State, Brazil. The samples were identified by MALDI-TOF MS. Biofilm production was evaluated on Congo Red Agar (CRA) and polystyrene plates. PCR was used to detect *icaA*, *icaB*, *icaC*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst-1*, *agr* and *mecA*. Expression of staphylococcal toxin genes in PCR positive samples was evaluated by qRT-PCR and the production of these toxins as well as hemolytic activity were *in vitro* evaluated. We also evaluated the antimicrobial resistance profile of the samples. For statistical analysis, cluster, chi-square test and correspondence were used. The study of the clonal diversity of the samples was performed by the *spa* typing, rep-PCR ((*GTG*)<sub>5</sub>) and MALDI-TOF MS techniques. The discriminatory power, the typability and the concordance between the typing techniques were evaluated. A total of 76 *Staphylococcus aureus* samples were analyzed. In the PCR, 18.42%, 18.42%, 2.63% and 77.63% of the samples were positive for *sea*, *tsst-1*, *sec* and *agr*, respectively. Staphylococcal toxin genes were of low expression in qRT-PCR and only two samples were TSST-producing. Most of the samples (61.84%) had hemolytic activity and were biofilm forming in CRA (69.73%) and in polystyrene plates (81.58%). None of the samples presented *mecA* neither presented a multiresistance pattern, with the highest resistance observed for Penicillin G (67.11%) and Tetracycline (27.63%). The most frequent genotype in the study was t605 (27%), followed by t002 (10.8%) and t521 (9.5%). *Spa* typing and (*GTG*)<sub>5</sub> presented high discriminatory power, in contrast to MALDI-TOF MS, which presented low discriminatory power and low concordance with typification genomic techniques. In conclusion, the samples presented toxigenic potential, with a higher prevalence of *sea* and *tsst-1*. We found that the biofilm production was the main virulence factor of the samples. Six clusters were formed whose distribution frequencies differed

for hemolytic activity, biofilm formation (qualitative and quantitative analyses) and resistance to Penicillin, Tetracycline and Erythromycin ( $P < 0.05$ ). *Staphylococcus aureus* samples showed high genetic diversity, and there are evidences that the presence of this microorganism in the final product is the result of cross-contamination of raw milk, serum-yeast (pingo) and asymptomatic manipulators of this bacterial agent. These findings emphasize the need for effective measures to prevent staphylococcal food poisoning by limiting *S. aureus* growth and enterotoxin formation, , as well as reinforcing the importance of implementing good manufacturing practices to reduce the risk of transmission of potentially pathogenic bacteria along the cheesemaking chain.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, toxins, biofilm, genic expression, quorum sensing, clonal diversity

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos tem sido foco de discussões nos últimos anos, devido ao grande impacto sobre a saúde da população. Nesse contexto, as intoxicações alimentares se destacam como responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que a cada ano, 76 milhões de norte-americanos são acometidos por doenças veiculadas por alimentos, ocorrendo 325 mil hospitalizações e 5.200 mortes. Deste total, os micro-organismos foram responsáveis por cerca de 14 milhões de toxinfecções, 60 mil hospitalizações e 1.800 mortes (Center for Diseases Control and Prevention). Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) ratificam o problema mundial e crescente da intoxicação alimentar. Aproximadamente, 582 milhões de pessoas adoecem e, destas, 351 mil morrem por ingerirem alimentos contaminados (World Health Organization, 2015).

No Brasil, dados sobre a ocorrência de intoxicações alimentares ainda são escassos. No estado de Minas Gerais, foram registradas 1.476 internações hospitalares por intoxicações alimentares no ano de 1996 (Brasil, 1996). Entre os anos de 2007 e 2016 foram notificados, no Brasil, 6.632 surtos de doenças veiculadas por alimentos com 118.104 pessoas doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos (Brasil, 2016). Segundo dados do Hospital do Coração (HCOR), em São Paulo, o número de pacientes com intoxicação alimentar atendidos cresceu 122% entre os anos de 2009 e 2013, passando de 280 casos para 624 a cada ano.

Dentre os patógenos mais relacionados a quadros de intoxicação alimentar, destaca-se *Staphylococcus aureus*. A intoxicação alimentar estafilocócica representa a segunda ou a terceira maior causa de intoxicação alimentar no mundo (Le Loir *et al.*, 2003), sendo o leite e os derivados lácteos, principalmente os queijos elaborados a partir de leite cru, os alimentos mais associados a esta ocorrência (Borges *et al.*, 2008).

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos elaborados a partir de leite cru produzidos no Brasil, sendo responsável pela geração de renda de grande

número de pequenos produtores rurais. Sete regiões produtoras tradicionais deste queijo em Minas Gerais são reconhecidas pelo Estado e possuem produtores cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra, Serro e, mais recentemente, o Triângulo Mineiro e a Serra do Salitre.

Campo das Vertentes é uma das doze mesorregiões de Minas Gerais e, embora tenha tradição secular na produção de queijos, foi reconhecida oficialmente como microrregião produtora do QMA somente em 2009 (Minas Gerais, 2009). A região é responsável pela produção de 313,512 mil litros de leite, cerca de 4 % do montante total do estado, e tem a melhor produtividade estadual por animal, correspondente a uma produção 2.049 litros por vaca por ano, dados que revelam o grande potencial desta mesorregião para a produção de queijos (IBGE, 2010). Além de uma expressiva aptidão leiteira, a região de Campo das Vertentes é também um importante polo turístico, o que contribui para a manutenção local da tradição de elaboração do QMA.

Na região de Campo das Vertentes, *Staphylococcus* spp., além de ter sido um dos micro-organismos predominantes no QMA, com contagens médias de  $1,1 \times 10^6$  UFC/g no período da seca e de  $3,5 \times 10^7$  UFC/g no período da chuva, também foi encontrado em contagens superiores a  $10^4$  UFC/mL em amostras de leite cru e soro-fermento, em ambos os períodos do ano estudados, indicando uma baixa qualidade das matérias-primas empregadas na elaboração do produto final (Castro *et al.*, 2016).

A presença de *Staphylococcus aureus* no QMA pode estar associada a condições precárias de higiene durante a elaboração do produto, utilização de temperaturas impróprias para a sua conservação, período de maturação inadequado do queijo, uso de soro-fermento (“pingo”) contaminado, bem como a presença de vacas com mastite no rebanho, determinando qualidade inadequada da matéria prima. Estima-se que cerca de 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus aureus*, sendo as fossas nasais, a cavidade oral, pele e pêlo, os locais de predileção do micro-organismo no homem (Stamford, 2006). Corroborando este fato, em trabalho recente realizado na região de Campo das Vertentes, 42,86% dos manipuladores



de QMA, das queijarias amostradas, foram portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo nas mãos (Castro, 2015). Por esta razão, a manipulação inadequada do QMA se torna uma importante fonte de contaminação do produto final.

A intoxicação alimentar estafilocócica é resultante da ingestão de toxinas produzidas e liberadas por algumas amostras de *Staphylococcus* spp. durante o seu desenvolvimento e a multiplicação no alimento contaminado. Estas toxinas são resistentes a ação de enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (Le Loir *et al.*, 2003), além de serem estáveis ao aquecimento. São descritas na literatura vinte e quatro Enterotoxinas Estafilocócicas (EE): incluindo aquelas denominadas como clássicas - SEA, SEB, SEC (1, 2 e 3), SED e SEE - os novos tipos - SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET - e as que não possuem atividade emética ou que ainda não foram testadas, as denominadas enterotoxinas-like - (SE/ls), SE/IJ, SE/IK, SE/IL, SE/IM, SE/IN, SE/IO, SE/IP, SE/IQ, SE/IU, SE/IV e SE/IX (Argudín *et al.*, 2010; Podkowik *et al.*, 2013).

O diagnóstico de intoxicação alimentar estafilocócica é geralmente confirmado pela associação de três fatores: a recuperação de mais de  $10^5$  UFC de *Staphylococcus* spp./g ou mL de alimento, o isolamento da mesma amostra de *Staphylococcus* spp. nos pacientes e no alimento e, por fim, a detecção de enterotoxinas no alimento, sendo esta última etapa fundamental para o diagnóstico conclusivo (Kerouanton *et al.*, 2007). A grande dificuldade na identificação da EE em alimentos é a pequena quantidade que ela é encontrada no alimento relacionado a surtos de intoxicação alimentar.

As EE, por serem proteínas simples, são incapazes de serem identificadas por métodos químicos. Sendo assim, podem ser rotineiramente detectadas por métodos biológicos, moleculares e imunológicos, que apresentam variações quanto à sensibilidade e especificidade (Santiliano *et al.*, 2011).

Os métodos moleculares pelas suas características de fácil execução, rapidez, automação e alta sensibilidade/especificidade se tornaram o método mais utilizado para diagnóstico de amostras bacterianas produtoras de EE em alimentos suspeitos em surtos de intoxicação

alimentar. Nesse sentido, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem sido com frequência aplicada como um método eficiente para a detecção dos genes responsáveis pela produção das EE em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de alimento. A detecção de genes toxigênicos indica a possibilidade de determinada amostra produzir a toxina, mesmo que essa característica não esteja sendo expressa e, conseqüentemente, a toxina não esteja sendo produzida (Oliveira, 2012). O estudo da expressão destes genes, por sua vez, permite conclusões mais precisas quanto a real capacidade do micro-organismo de produzir a toxina no alimento. Nesse contexto, a PCR em tempo real (qPCR) tem se revelado uma técnica inovadora na avaliação das amostras bacterianas produtoras de EE, pela possibilidade de quantificar o DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação, de maneira precisa e com maior reprodutibilidade (Bastos, 2013).

Na última década, os métodos moleculares também têm sido o método de predileção na tipificação de amostras de *Staphylococcus aureus*. Em alimentos, a tipificação deste micro-organismo tem sido usada como ferramenta de monitoramento epidemiológico de amostras patogênicas, principalmente por fornecer dados que permitem conclusões mais precisas sobre o caráter clonal de uma certa população e a similaridade genética entre amostras obtidas de diferentes origens (Dabul, 2014). Nesse sentido, o sequenciamento da região polimórfica X do gene *spa*, que codifica a proteína A de *Staphylococcus aureus*, tem sido usado rotineiramente na tipificação de amostras de *Staphylococcus aureus*. Em relação aos demais métodos de tipificação como o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e o MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), o *spa typing*, como é denominada a técnica, combina inúmeras vantagens como a rapidez, reprodutibilidade e a capacidade de importação/exportação de dados para bancos de dados virtuais (Viçosa, 2012). Assim, torna-se possível a comparação de dados locais com dados mundiais, permitindo uma melhor compreensão sobre o caráter genético das populações em estudo.

Como método molecular alternativo de tipificação de *Staphylococcus aureus*, destaca-se a reação em cadeia da polimerase baseada em sequências repetitivas de elementos (rep-PCR), que representa uma técnica de fácil execução em contraposição à métodos que exigem equipamento especializado inatingível para laboratórios clínicos de rotina (Švec *et al.*, 2010). A tipificação de

isolados bacterianos por uma abordagem proteômica, por outro lado, tem ganhado espaço no cenário de estudos de epidemiologia local e global, como uma técnica alternativa aos métodos de tipificação baseados em sequências genômicas (Singhal *et al.*, 2015). A técnica denominada *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF MS) associada à espectrometria de massa foi recentemente destacada como um método de tipificação poderoso apropriado, suficientemente reprodutível e sensível para examinar de forma rápida a evolução dos fenótipos bacterianos existentes ou emergentes (Berrazeg *et al.* 2013; Mencacci *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017).

Além da produção das EE, outros fatores de patogenicidade são relevantes na determinação da patogenicidade de amostras de *Staphylococcus aureus* obtidas de alimento. Entre eles, os fatores associados à aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, determinantes na formação de biofilmes, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno e da enzima coagulase; os fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como as toxinas esfoliativas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) e os polissacarídeos capsulares, além das próprias EE e, por fim, os fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos, como a produção de hemolisinas.

A expressão gênica de alguns fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*, como as EE e a hemolisina alfa, é controlada pelo sistema regulatório global *accessory gene regulator* (*agr*) (Novick *et al.*, 1993). Este é um sistema de transdução de sinal, característico do gênero *Staphylococcus*, e que permite a modulação da expressão de diversos genes de acordo com a densidade celular em um mecanismo de *quorum sensing*. O *agr* é também coadjuvante na modulação da resposta de *Staphylococcus aureus* no que diz respeito à formação de biofilmes (Beenken *et al.*, 2010). Acredita-se que a expressão de *agr* limita a formação de biofilme, e este fato poderia atuar na dispersão de *Staphylococcus aureus* de um biofilme já estabelecido (Kong *et al.*, 2006; Yarwood *et al.*, 2007; Boles e Horswill, 2008). Mutações naturais no *locus agr* podem determinar aumento de capacidade de adesão do micro-organismo bem como redução da

produção de exotoxinas, sugerindo que *agr* é, por si só, um importante fator de patogenicidade de *Staphylococcus* spp. (Bassani, 2009).

Outro sério problema para a saúde pública associada à presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos é a resistência destes aos antimicrobianos, devido à possibilidade de transmissão desta resistência ao homem, por meio da ingestão do alimento contaminado (Luz, 2008). *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) aparece, hoje, como o principal exemplo de resistência bacteriana no mundo, pelo fato de desencadear infecções graves que limitam as opções terapêuticas, prolongando, assim, o tempo de tratamento destas (Ibed e Hamim, 2014). Por muitos anos, amostras MRSA foram reconhecidas como patógenos exclusivos de hospitais. Porém, estudos têm documentado a disseminação de MRSA em alimentos (Pesavento, *et al.*, 2007, Kamal *et al.*, 2013, Costa *et al.*, 2015).

Nesse contexto, estudar a diversidade ecológica e caracterizar o potencial patogênico de *Staphylococcus aureus* isolados de QMA, leite cru, soro-fermento e manipuladores de Campo das Vertentes constituem importante ferramenta epidemiológica para a determinação do risco potencial de intoxicação alimentar estafilocócica associada ao consumo do QMA. Embora o QMA seja de grande importância histórica e cultural para a região de Campo das Vertentes, pouca informação se tem, na literatura, a respeito da segurança de consumo associada ao queijo elaborado nesta região. Nesse sentido, este estudo permitirá o conhecimento acerca da dispersão de amostras potencialmente patogênicas dentro dos núcleos produtores, alertando para a necessidade de cuidados tecnológicos e higiênico-sanitários na linha de produção do QMA, de forma a contribuir para a segurança de consumo deste produto e, conseqüentemente, para a sua preservação sociocultural.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo Geral*

Caracterizar, por métodos fenotípicos e genotípicos, o potencial patogênico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, bem como estudar a diversidade clonal dessas amostras.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Caracterizar fenotipicamente as amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de QMA, leite cru, soro-fermento e manipuladores
- Caracterizar genotipicamente as amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de QMA, leite cru, soro-fermento e manipuladores por meio da identificação genética de fatores determinantes da patogenicidade (enterotoxinas estafilocócicas, toxina da síndrome do choque tóxico, locus de adesão intercelular (*ica*) e regulador de *quorum sensing* (*agr*)).
- Estudar a diversidade clonal da população de *Staphylococcus aureus*
- Comparar o poder discriminatório, a tipabilidade e a concordância entre as técnicas de tipificação aplicadas no estudo (*spa typing*, *rep-PCR* e MALDI-TOF MS).
- Avaliar a expressão dos genes que codificam a expressão das enterotoxinas
- Identificar a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* frente a antimicrobianos de diferentes classes.
- Investigar genotipicamente a presença de *Staphylococcus aureus* metilina resistente nas amostras.

# **Capítulo 1**

**Caracterização microbiológica, fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* associados às intoxicações alimentares: Revisão de Literatura**

## 1. *Staphylococcus aureus*

A primeira descrição de *Staphylococcus* spp. (do grego “staphyle” = cacho de uvas, e “cocos” = grão), na literatura, foi realizada por Ogston, um médico escocês, em 1883. Ele relatou a presença de cocos arranjados em formato de cacho de uva que estavam associados à inflamação e às lesões supurativas em humanos. Em 1884, a bactéria recebeu identificação taxonômica por Rosenbauch e, em 1890, foi isolada de glândulas bovinas inflamadas (Divers e Peek, 2008).

*Staphylococcus aureus* são micro-organismos pertencentes à família *Staphylococcaceae*, cocos Gram e catalase positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, não-esporulados e, geralmente, não-encapsulados, que ocorrem microscopicamente em agrupamentos semelhantes a cachos de uvas. Porém, podem também ser encontrados isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, dependendo da idade da colônia. Diferenciam-se das outras espécies de estafilococos por produzirem enzima coagulase, e utilizarem os açúcares manitol e trealose, com produção de ácido após a fermentação (Jay *et al.*, 2005).

*Staphylococcus aureus* habitam a pele e a mucosa de animais de sangue quente, incluindo o homem, são micro-organismos mesófilos e apresentam ampla faixa de crescimento, entre 7°C e 48°C, sendo a temperatura ótima entre 20°C e 37°C. Sob uma ampla faixa de temperatura, entre 10°C e 48°C, sendo a temperatura ótima de 40 a 45°C, são capazes de produzir enzimas e exotoxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas (EE) (Jorda *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus* possuem versatilidade nutricional e apresentam capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes condições ambientais por um longo período de tempo (Le Loir *et al.*, 2003). Essas bactérias crescem em alimentos com atividade de água superior a 0,86 e pH entre 4,5 e 9,3 e ainda toleram ambientes com até 10% a 20% de NaCl (Jay *et al.*, 2005).

*Staphylococcus aureus* estão entre os patógenos mais relacionados a surtos de intoxicação alimentar, sendo o leite e os derivados lácteos, principalmente os queijos elaborados a partir de leite cru, como o queijo Minas artesanal, os alimentos mais associados à ocorrência de casos de intoxicação alimentar estafilocócica (Borges *et al.*, 2008). A presença de *Staphylococcus aureus*

em queijos elaborados a partir de leite cru pode estar associada a condições precárias de higiene durante a elaboração do produto, utilização de temperaturas impróprias para a sua conservação, período de maturação inadequado do queijo, bem como a presença de vacas com mastite no rebanho, determinando uma qualidade inadequada da matéria prima. Estima-se que cerca de 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus aureus*, sendo as fossas nasais, a cavidade oral, pele e pêlo, os locais de predileção do micro-organismo no homem. Por esta razão, a manipulação inadequada do produto final e de suas matérias-primas é uma importante fonte de contaminação do queijo (Stamford *et al.*, 2006).

## **2. Caracterização microbiológica de *Staphylococcus aureus***

A caracterização ou tipificação de isolados microbianos é importante no estudo epidemiológico e podem ser aplicadas na identificação do patógeno e da detecção da fonte de infecção ou de um surto de intoxicação alimentar, por exemplo. Adicionalmente, são também usadas como ferramentas na investigação dos genes de patogenicidade, da resistência aos antimicrobianos e da relação clonal de micro-organismos associados a um determinado evento a ser estudado (Levis *et al.*, 1999). As técnicas de tipificação microbiológica são específicas e podem ser baseadas tanto em parâmetros fenotípicos quanto genotípicos das bactérias. A combinação de métodos de tipificação fenotípicos e genotípicos é a melhor forma para compreensão da epidemiologia da intoxicação alimentar estafilocócica (Shimizu *et al.*, 2000).

### **2.1. Fenotípica**

Os procedimentos fundamentados no fenótipo são aqueles que possibilitam a diferenciação das amostras por meio da caracterização dos produtos da expressão gênica. Em *Staphylococcus aureus* essa caracterização se baseia, geralmente, no estudo da produção de determinadas proteínas, como a enzima coagulase e as toxinas estafilocócicas, produção de



catalase, fermentação do manitol, e estudo do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (Tenover *et al.*, 1997). Embora estes métodos sejam razoavelmente sensíveis, eles nem sempre permitem a discriminação precisa de espécies ou de amostras intimamente relacionadas (Randazzo *et al.*, 2009). Uma alternativa para melhorar o poder discriminatório das técnicas fenotípicas surgiu com a aplicação de métodos de diagnóstico rápidos automatizados de elevada sensibilidade, exatidão e precisão, como os que empregam a tecnologia de espectrometria de massa (Barreiro, 2010). Nesse sentido, a técnica *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF)* tem ganhado espaço na caracterização de amostras de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos alimentares e em quadros de infecção.

De forma simplificada, a técnica de MALDI-TOF consiste na caracterização de moléculas pela medida da relação massa/carga ( $m/z$ ) de amostras ionizadas em fase gasosa. Assim, a amostra inicial é embebida em uma matriz ácida capaz de fornecer prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra. As matrizes mais utilizadas são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico), que permite o estudo de oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas; o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico) e  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA), estes dois últimos mais utilizados para o estudo de proteínas (Gonçalves, 2007; Carbonelle *et al.*, 2011). Há a formação de uma co-cristalização da amostra com essa matriz, de forma que quando esta absorve a energia emitida por um laser, ocorre simultaneamente o fenômeno de ionização (transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra), e o de dessorção (fenômeno de retirada de substâncias adsorvidas ou absorvidas por outras), o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso (Goulart e Resende, 2013). Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são então acelerados por meio de um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, no qual são separados de acordo com suas  $m/z$ , direcionados para o analisador TOF, em diferentes tempos de voos, no qual serão individualmente analisados, e, posteriormente, detectados (Cunha *et al.*, 2006; Ferreira, 2009; Croxatto *et al.*, 2012). Na identificação de micro-organismos, uma grande quantidade de moléculas é detectada simultaneamente como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, gerando um espectro

que é característico de cada espécie (Assis *et al.*, 2011). Alguns picos (massas moleculares) são específicos para gênero, espécie e, por vezes, subespécies, sendo esta técnica comumente utilizada no agrupamento de amostras envolvidas em estudos de infecção e de surtos alimentares (Welkera e Moorec 2011).

## 2.2. Genotípica

Os métodos genotípicos são baseados na análise da estrutura genética do micro-organismo em que se utilizam, por exemplo, enzimas de restrição, amplificação e expressão de ácidos nucleicos e sequenciamento de nucleotídeos (Foley *et al.*, 2009). Métodos de identificação baseados na extração do DNA ou RNA oferecem a possibilidade de detecção confiável, reprodutível, rápida, sensível e específica de micro-organismos, além de permitirem a detecção de genes codificadores de fatores de patogenicidade, a caracterização interespecies, estudos taxonômicos e de epidemiologia molecular destes. Nesse sentido, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) se destaca na atualidade como a técnica de escolha para diagnóstico molecular dos micro-organismos envolvidos em surtos alimentares.

A PCR é caracterizada pela amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos utilizando oligonucleotídeos iniciadores, denominados de *primers*. Assim, em poucas horas, após a reação de polimerização, há a síntese, *in vitro*, de uma grande quantidade de determinado fragmento de DNA ou RNA de interesse (Mattos, 2005). O ácido nucleico extraído é, então, submetido à eletroforese em gel de agarose para separação de seus fragmentos com base no seu tamanho (peso molecular) por meio de aplicação de corrente elétrica. Após a migração das partículas no gel, quando este é pigmentado com um corante próprio como o brometo de etídio, por exemplo, os fragmentos do ácido nucleico extraído podem ser vistos como bandas em aparelho próprio para este fim (fotodocumentador), cada uma representando um grupo de fragmentos de ácido nucleico de mesmo tamanho. Entretanto, embora a PCR seja um teste específico, ela não é capaz, pelo método convencional supramencionado, de assegurar que os

genes amplificados de fato estão sendo expressos pelo micro-organismo (Sasaki *et al.*, 2005). Desta forma, a *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative Real Time* (RTq-PCR ou qRT-PCR), uma modalidade mais específica da PCR, tem sido amplamente utilizada para avaliar a expressão gênica de micro-organismos isolados de alimentos (Even *et al.*, 2009; Duquenne *et al.*, 2010; Nouaille *et al.*, 2014).

A qRT-PCR usa como modelo para a reação o RNA mensageiro (RNAm) extraído do micro-organismo. Por ser uma molécula muito instável, o RNA é então transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA), usando a enzima transcriptase reversa, e este cDNA que será amplificado e quantificado na reação de qPCR. Assim, por meio da adição de corante fluorescente (Sybr green ou Taqman Probe) às reações de PCR do cDNA, o resultado da qPCR pode ser visualizado imediatamente, dispensando a eletroforese, o que configura uma vantagem dessa técnica. A fluorescência, detectada a partir de um número de ciclos de amplificação da amostra, conhecido como CT ou *cycle threshold*, cresce proporcionalmente à medida que o cDNA é amplificado, de forma que o equipamento seja capaz de detectar a fluorescência produzida pela amostra e apresentar os resultados em tempo real (Morgante e Blawid, 2016). Adicionalmente, por meio do monitoramento da taxa de aumento da fluorescência na reação de PCR, é possível determinar com precisão a quantidade de cDNA-alvo presente na amostra original. Assim, o sinal de fluorescência gerado durante a reação é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo dos ciclos de amplificação (Oliveira, 2010; Morgante e Blawid, 2016). Por fim, após as amplificações do cDNA, são realizados os cálculos para determinação da expressão relativa ou absoluta de cDNA nas amostras. Tanto a expressão gênica relativa quanto a absoluta determinada pela PCR em tempo real utilizam o valor de Ct como referência para a quantificação da expressão de determinada sequência gênica-alvo. Na quantificação absoluta o valor Ct é comparado com uma curva padrão de amplificação do gene-alvo utilizando-se um padrão com concentração inicial conhecida (número de cópias de DNA/uL) em diferentes diluições. Já a expressão relativa é baseada na taxa de expressão de um gene alvo comparada com um gene referência (controle endógeno ou *housekeeping*). Os genes de referência são utilizados como

controles internos da expressão gênica, uma vez que apresentam expressão teoricamente constante, ou seja, sofrem pouca variação de sua expressão nos tecidos e células diante de fatores externos e sob os diferentes tratamentos em um experimento (Pfaffl e Hageleit 2001, Vandermompele *et al.*, 2001).

Apesar de ser uma técnica com elevada sensibilidade e especificidade, a RT-qPCR é passível de variações que podem comprometer suas reprodutibilidade e eficiência, tais como: variações nas pipetagens, a qualidade e integridade das amostras (molde de RNA e cDNA), desenho dos *primers*, condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos *primers*), qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Apesar de todos os fatores supramencionados de variabilidade experimental, a RT-qPCR tem sido uma das principais ferramentas aplicadas no diagnóstico clínico-laboratorial.

Nos últimos anos, os métodos genotípicos de tipagem de *Staphylococcus aureus* tem ganhado força no cenário das investigações de surtos alimentares e de infecções, com o objetivo de compreender a diversidade genética, identificar possíveis novos perfis, conhecer a distribuição dos isolados, testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão de patógenos e de monitorar reservatórios de micro-organismos epidêmicos. Nesse sentido, as técnicas de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) foram as primeiras a serem utilizadas no estudo da diversidade genética de *S. aureus*. Enquanto a primeira era a de escolha nos estudos de longos prazos ou de epidemiologia global da população, a segunda era o método de eleição nos estudos de surto ou de epidemiologia local do patógeno (Mathema *et al.*, 2008).

Após a compreensão de que *Staphylococcus aureus* possui uma população essencialmente clonal, cujas variações se devem sobretudo a eventos mutacionais e raramente a eventos de recombinações, e que a velocidade de ocorrência de eventos genéticos determina alto desequilíbrio de ligação na espécie, tornou-se possível a utilização de um único locus para a tipagem de *Staphylococcus aureus*, em contrapartida a técnica de MLST que envolve em sua metodologia o uso de sete genes conservados do micro-organismo (Koreen *et al.*, 2004). Nesse sentido, a genotipagem baseada na análise de DNA repetitivo, em especial os VNTRS (*variable*

*number tandem repeats*) de um único *locus* tem sido utilizada no estudo da diversidade genética de *Staphylococcus aureus*. Dentre esses genes utilizados com esse propósito, destaca-se o *spa*, utilizado na técnica de *spa typing*.

O *spa typing* é uma metodologia específica para tipagem de *S. aureus* que consiste em analisar o polimorfismo do gene da região X da proteína A, componente da parede celular de *S. aureus*. Esta região é composta por um número variável de repetições de 24 pb que são flanqueadas por regiões bem conservadas. A diversidade dessa região é atribuída a deleções, duplicações e a mutações pontuais (Koreen *et al.*, 2004). Um tipo de *spa* se diferencia do outro pela ordem de suas repetições, e uma repetição se diferencia da outra por pelo menos uma mutação pontual. A região X proteína A apresenta variabilidade o suficiente para diferenciar as amostras de um estudo e a estabilidade necessária para agrupar as amostras relacionadas, o que tem tornado essa região um método eficiente de escolha de genotipagem de *Staphylococcus aureus* (Shopsin *et al.*, 1999). Além disso, apresenta vantagens em relação às técnicas tradicionais de MLST e PFGE, como: alto poder discriminatório para estudos de longo e curto prazo por indexar simultaneamente micro e macrovariações; maior facilidade de uso pela utilização de *softwares* que permitem a fácil análise de dados e comparação entre laboratórios de todo o mundo; rapidez e simplicidade, por envolver a utilização de um único *locus*, e menor custo operacional.

A variabilidade das sequências dos genes pode ser avaliada ainda por meio de técnicas de impressões genéticas digitais (*fingerprints*). Essas abordagens são amplamente utilizadas para avaliar diferenças entre os perfis de comunidades microbianas (Zhu *et al.*, 2014; Heras *et al.*, 2015). Nesse sentido, a reação em cadeia da polimerase baseada em sequências repetitivas (rep-PCR) tem se mostrado uma técnica eficiente no estudo da diversidade genética de *Staphylococcus aureus*. Esta técnica se baseia na utilização de *primers* de DNA complementares a sequências de DNA altamente conservadas e repetitivas presentes em múltiplas cópias do genoma do micro-organismo. Ao final da reação de amplificação dessas sequências, é realizada a análise dos fragmentos de DNA gerados de tamanhos variados que podem ser separados em géis de agarose. Por meio de programas específicos para tal fim, há o agrupamento das amostras de acordo o perfil

de bandas geradas pela eletroforese dos fragmentos de DNA gerados na reação de amplificação, de forma que tem se obtido com alta reprodutibilidade e confiabilidade a diferenciação de microorganismos, incluindo *Staphylococcus aureus*, ao nível de gênero, espécie, subespécies e linhagens (Švec *et al.*, 2010).

### **3. Intoxicação alimentar estafilocócica**

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem aumentando de modo significativo em nível mundial. O crescente aumento das populações, o processo de urbanização desordenado, a produção de alimentos em grande escala somados a baixa eficiência de ação dos órgãos de vigilância e inspeção sanitária são fatores relacionados à emergência destas doenças.

As intoxicações alimentares são de grande importância no cenário das DTA, tanto do ponto de vista de saúde pública quanto em relação às graves consequências econômicas para a sociedade. Entretanto, devido à falta de notificação dos surtos às autoridades públicas, os dados epidemiológicos a respeito desta doença são subestimados. Dentre os patógenos mais relacionados a surtos de intoxicação alimentar, destacam-se as bactérias do gênero *Staphylococcus*, sendo o leite e os derivados lácteos, principalmente os queijos, os alimentos mais associados à ocorrência de casos de intoxicação alimentar estafilocócica (Borges, 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (EE) produzidas por *Staphylococcus* enterotoxigênicos, como *S. aureus* (com maior prevalência), *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, entre outras espécies. Tal intoxicação constitui a segunda ou a terceira maior causa de intoxicação alimentar no mundo (Le Loir *et al.*, 2003).

Embora a legislação brasileira para inspeção de leite e seus derivados preconize apenas a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, como parâmetro de segurança microbiológica do produto, relacionando a produção de coagulase ao risco direto de síntese de EE, sabe-se que a relação entre esses dois fatores não é absoluta. Muitos estudos têm demonstrado que algumas

amostras de SCN são, assim como amostras de SCP, potencialmente produtoras de enterotoxinas e, inclusive, agentes de surtos alimentares (Veras *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2016).

A intoxicação alimentar estafilocócica manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. Há relatos na literatura de que a quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença varia de 0,01 a 0,4µg por grama do alimento (Orden *et al.*, 1992), mas sabe-se que esta quantidade depende da susceptibilidade do indivíduo, do peso corporal e, especialmente, do estado de saúde e resposta imune da pessoa acometida (Jablonski e Bohach, 2001).

A doença tem início repentino e com sinais agudos, sendo o período de incubação variável de 30 minutos a oito horas após a ingestão do alimento contaminado (Bannerman, 2003). Os sintomas normalmente são caracterizados por náusea, vômitos, cólicas, prostração, hipotensão e hipotermia (Le Loir *et al.*, 2003). A doença tem caráter autolimitante, sendo que a recuperação ocorre em torno de dois dias. Em alguns casos, pode levar mais tempo ou exigir hospitalização (Nema *et al.*, 2007).

A intoxicação alimentar estafilocócica é raramente notificada aos serviços de vigilância epidemiológica por diversas causas: por ser uma doença, normalmente, autolimitante, de curta duração, muitas vezes, confundida com outros tipos de enfermidades que apresentem sintomas semelhantes, por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais impróprios ou por investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. Desta forma, os dados de surtos e casos de intoxicação alimentar estafilocócica, bem como a prevalência de tipos de enterotoxinas estafilocócicas, incluindo o Brasil, são subestimados (Martin *et al.*, 2004).

Em pesquisa realizada no estado do Paraná, no período compreendido entre os anos de 1978 e 2000, a intoxicação alimentar estafilocócica ocupou o primeiro lugar entre as ocorrências de DTA, com 492 surtos (41,2% no total) (Amson *et al.*, 2006). Nos anos de 1993 a 2002, foram notificados 18 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos no Brasil (Balaban e Rasooly, 2000). No estado de Minas Gerais foram registrados 12.820 casos de

intoxicação estafilocócica entre os anos de 1995 a 2001, causando 17 mortes após consumo de alimentos contaminados, segundo o Instituto Panamericano de Proteção dos Alimentos e Zoonoses (Chaves, 2012). No estado de São Paulo foram notificados 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002.

Por outro lado, em países cujo sistema de vigilância epidemiológica atua de forma eficaz é possível obter dados mais precisos e condizentes com a realidade dos quadros de intoxicação alimentar estafilocócica. Entre 1993 e 1997 foram notificados 42 surtos de intoxicação estafilocócica nos EUA, envolvendo 1.413 pessoas e causando um óbito (Center for Diseases Control and Prevention, 2000). Na França, entre 2006 e 2009, 3.127 surtos de intoxicação alimentar foram reportados às autoridades sanitárias, com acometimento de 33.404 pessoas, dentre as quais 15 foram a óbito. *Staphylococcus aureus* foi o segundo agente mais prevalente nestes surtos (16%), ficando atrás somente de *Salmonella* spp.; porém, o agente mais frequentemente associado aos casos suspeitos e não confirmados (37,9%) (Delmas *et al.*, 2010). Na Coreia do Sul, entre 2002 e 2006, *S. aureus* esteve relacionado com a ocorrência de 81,5% dos casos e surtos de intoxicação alimentar, nos quais o agente foi efetivamente confirmado (Lee *et al.*, 2009). Na China, *S. aureus* é responsável pela ocorrência de 25% dos casos de intoxicação alimentar, atingindo 40% em algumas áreas do país (Tang *et al.*, 2011).

### **3.1. Fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* associados à intoxicação alimentar estafilocócica**

A patogênese da intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus aureus* depende da capacidade da linhagem de sobreviver e colonizar uma superfície, de se multiplicar sob uma variedade de condições e, por fim, de produzir as EE no alimento (Carson *et al.*, 2002). Para que isso aconteça, é necessário que *Staphylococcus aureus* seja capaz de produzir uma série de fatores de patogenicidade específicos, que podem ser definidos como estruturas, produtos ou estratégias



que contribuem para que o micro-organismo aumente sua capacidade de causar doenças (Velázquez-Meza, 2005).

O principal fator de patogenicidade associado aos quadros de intoxicação alimentar estafilocócica é a enterotoxina estafilocócica, sendo este o único fator indispensável para o desenvolvimento do quadro clínico no homem (Le Loir *et al.*, 2003). Outros fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* importantes à ocorrência da intoxicação alimentar são aqueles ligados à formação de biofilme, principal forma de apresentação do micro-organismo que o auxilia na colonização do alimento ou das plantas de processamento do alimento. Nesse sentido, podem ser citados os fatores associados à membrana celular do micro-organismo, como algumas adesinas e o ácido teicóico, e aqueles ligados à produção de fatores extracelulares, que irão auxiliar na estruturação da matriz do biofilme, como certas proteases e autolisinas (Gustafson *et al.*, 2014).

Para produzir os fatores de patogenicidade, é necessário que *Staphylococcus aureus* resistam às condições adversas do meio em que está. Além disso, é importante que estes fatores atuem de forma coordenada no micro-organismo, de forma que eles sejam expressos em momentos específicos do crescimento bacteriano (Morrison e Dunman, 2011). Desta forma, a coordenação da expressão dos fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* e os mecanismos pelos quais estes micro-organismos sobrevivem em ambientes hostis constituem, por si só, importantes fatores de patogenicidade associados ao desenvolvimento do quadro de intoxicação alimentar no homem. E, por isso, serão abordados nos tópicos adiante, em detalhes.

### **3.1.1. Papel das enterotoxinas estafilocócicas nas intoxicações alimentares**

#### **3.1.1.1. Características gerais das enterotoxinas estafilocócicas**

As enterotoxinas estafilocócicas constituem um grupo de proteínas extracelulares de cadeia simples, com baixo peso molecular (26.900 a 29.600 Daltons) e ponto isoelétrico entre 7,0 a 8,6. Elas são ricas em aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de tirosina. As EE são pertencentes à família das toxinas pirogênicas (PT), juntamente com a toxina da síndrome

do choque tóxico (TSST), as toxinas esfoliativas tipos A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) (Luz, 2008).

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (Le Loir *et al.*, 2003). A produção de EE ocorre durante toda fase do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a fase exponencial (Soriano *et al.*, 2002). Além disso, elas são estáveis ao aquecimento (Murray *et al.*, 1992), não são totalmente inativadas por tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultra pasteurização (Jay *et al.*, 2005).

As EE são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Com base em diferenças antigênicas, são descritas na literatura vinte e quatro EE: As denominadas clássicas - EEA, EEB, EEC (1, 2 e 3), EED e EEE - os novos tipos - EEG, EEH, EEI, EER, EES e EET - e as EE que não possuem atividade emética ou que ainda não foram testadas, as denominadas enterotoxinas-like - (EE/s), EE/J, EE/K, EE/L, EE/M, EE/N, EE/O, EE/P, EE/Q, EE/U, EE/V e EE/X (Argudín *et al.*, 2010; Podkowik *et al.*, 2013). Embora a maioria dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica seja atribuída às EE clássicas, EEA, EEC, EEB, EED e EEE, em ordem decrescente de ocorrência (Cremonesi *et al.*, 2005), sabe-se que EEG, EEH e EEI podem levar a quadros de intoxicação alimentar estafilocócica, indicando que a importância das “novas” EE pode estar sendo subestimada (Cenci-Goga *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

As enterotoxinas apresentam estreita identidade genética entre si, sendo que algumas compartilham um alto grau de similaridade gênica em suas sequências nucleotídicas e, também em suas cadeias de aminoácidos. O grupo que consiste em genes codificadores de EEA, EEE e EED apresenta uma homologia de sequência na sua cadeia de aminoácidos variando entre 50 e 83%. Outro grupo compreende EEC e EEB, com uma sequência homóloga de 42 a 68%. EEJ, bem como EEI e EEH, por sua vez, são caracterizadas com uma homologia com as outras enterotoxinas variando entre 27% e 64% (Balaban e Rasooly, 2000; Zocche, 2008).

A princípio, TSST-1 foi equivocadamente identificada como EEF e, por isso, não existe a enterotoxina F. No entanto, essa toxina foi renomeada com a sigla TSST-1 devido à ausência de atividade emética quando testada em macacos (Fueyo *et al.*, 2005), que é uma evidência necessária para a caracterização da enterotoxina. Pequenas variações antigênicas de EEC1, 2, 3 têm sido descritas, assim como duas SEH distintas. Além disso, algumas variantes também foram relatadas para SEG, SEI e SEU (Letertre *et al.*, 2003).

As EE são codificadas por genes (*se*) que apresentam particularidades quanto a sua localização e expressão. De forma geral, estão localizados em elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídios, ilhas de patogenicidade cromossomal, trasposons ou em regiões flaqueadoras de cassete cromossomal (quadro 1). A presença destes genes em elementos genéticos móveis em uma amostra de *Staphylococcus aureus* implica em possível mobilidade de uma molécula de DNA para outra, ou de uma bactéria para outra, em processo conhecido como transferência horizontal de genes, conferindo uma vantagem seletiva e evolutiva ao micro-organismo receptor (Blaiotta *et al.*, 2004; Omoe *et al.*, 2005).

Quadro 1: Características das enterotoxinas estafilocócicas

Enterotoxina Estafilocócica (EE)	Peso molecular (Da)	Gene codificador	Localização genética	Ação superantigênica	Ação emética
EEA	27.100	<i>sea</i>	Prófago	+	+
EEB	28.336	<i>seb</i>	SaPI	+	+
EEC	27.531	<i>sec</i>	SaPI	+	+
EED	28.360	<i>sed</i>	Plasmídeo	+	+
EEE	26.425	<i>see</i>	Prófago	+	+
EEG	27.043	<i>seg</i>	Egc	+	+
EEH	25.210	<i>seh</i>	Transposon	+	+
EEI	24.298	<i>sei</i>	Egc	+	+
EEJ	28.565	<i>selj</i>	Plasmídeo	+	NC
EE/K	25.539	<i>selk</i>	SaPI	+	NC
EE/L	24.593	<i>sell</i>	SaPI	+	-

EE/M	24.842	<i>selm</i>	Egc	+	NC
EE/N	26.067	<i>seln</i>	Egc	+	NC
EE/O	26.777	<i>selo</i>	Egc	+	NC
EE/P	27.000	<i>selp</i>	Prófago	+	NC
EE/Q	25.207	<i>selq</i>	SaPI	+	-
EER	27.049	<i>Ser</i>	Plasmídeo	+	+
EES	26.217	<i>Ses</i>	Plasmídeo	+	+
EET	22.614	<i>Set</i>	Plasmídeo	+	+
EE/U	27.100	<i>Selu</i>	Egc	+	NC
EE/V	24.997	<i>Selv</i>	Egc	+	NC

Fonte: Adaptado de Hennekinne *et al.* (2010) e Schelin *et al.* (2011)

Legenda: egc=*enterotoxin gene cluster*; SaPI=Ilha de Patogenicidade; NC= Não conhecida

### 3.1.1.2. Mecanismos de ação das enterotoxinas estafilocócicas

Segundo Franco e Landgraf (2003), as enterotoxinas podem apresentar várias ações no hospedeiro, sendo elas: ação emética, ação diarreica e atividade de superantígeno. A ação emética é a mais frequentemente observada nos quadros de intoxicação alimentar estafilocócica e, segundo Dinges *et al.* (2000), os receptores das enterotoxinas estariam localizados, sobretudo, no intestino. Dessa forma, o estímulo seria transferido por meio do nervo vago até o centro do vômito, que compõe o Sistema Nervoso Central (SNC). Este centro levaria à retro peristalsia do estômago e do intestino delgado provando o vômito.

A diarreia constitui o segundo sintoma mais observado na intoxicação alimentar estafilocócica. O seu mecanismo de ação não é completamente esclarecido. Acredita-se que, diferentemente das diarreias provocadas por toxinas de *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* que dilatam a alça intestinal, as enterotoxinas estafilocócicas causariam uma inflamação e irritação da mucosa gastrointestinal, além de inibirem a reabsorção de eletrólitos e água no intestino delgado (Dinges *et al.*, 2000).

Por fim, a atividade de superantígeno das enterotoxinas estafilocócicas advém das características compartilhadas entre elas e as demais toxinas pertencentes ao grupo conhecido

como superantígenos de toxinas pirogênicas, no qual TSST-1 e as toxinas estreptocócicas também fazem parte. Estas enterotoxinas interagem diretamente com as células T receptoras de antígenos (TCR), na cadeia V $\beta$ , e com o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), classe II, das células apresentadoras de antígenos (APC). Esta interação ocasiona a ativação e proliferação de células T não-específicas e na secreção exarcebada de interleucinas, que levam a mecanismos lesivos ao hospedeiro (Le Loir *et al.*, 2003). Esta propriedade conferiu a essas moléculas a designação de “superantígenos” devido à proporção de a resposta imune ser muito maior do que aquela induzida por um antígeno convencional.

As citocinas organizam interações intercelulares e regulam a resposta imune; porém, a produção excessiva pode ser muito danosa para o hospedeiro, ocasionando isquemia vascular, trombose, coagulação intravascular disseminada, falência de múltiplos órgãos o aumento da permeabilidade capilar e, finalmente, o quadro de choque tóxico. Dentre as citocinas inflamatórias liberadas pelos superantígenos estão o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) (Stevens *et al.*, 1993).

### **3.1.1.3. Ocorrência de *Staphylococcus enterotoxigênico* e de suas enterotoxinas em leite e derivados**

As presenças de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos e suas enterotoxinas têm sido constatadas com frequência em leite e seus derivados, sobretudo em queijos elaborados a partir de leite cru como o queijo Minas artesanal. A presença de *Staphylococcus aureus* nesses produtos pode estar associada às condições precárias de higiene durante a elaboração do produto, à utilização de temperaturas impróprias para a sua conservação, ao período de maturação inadequado do queijo, bem como à presença de vacas com mastite no rebanho, tendo em vista que *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de mastite nos rebanhos. Estima-se que cerca de 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus aureus*.

Por esta razão, a manipulação inadequada do produto é também uma importante fonte de contaminação do produto final (Stamford *et al.*, 2006).

Vários são os estudos nacionais e internacionais que abordaram a ocorrência de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e de suas enterotoxinas em leite e seus derivados. Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2011), 574 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite cru foram analisadas quando a produção de EE. Além disso, a relação entre a presença das enterotoxinas, da coagulase e da termonuclease (Tnase) também foi estudada. Os resultados mostraram que 19% dos *Staphylococcus* isolados eram enterotoxigênicos, sendo capazes de produzir no mínimo uma das EE (EEA, EEB, EEC e EED). A maioria das amostras foi capaz de produzir a enterotoxina D (68,8%), enquanto que 12,8% das amostras foram capazes de produzir a enterotoxina A. Ao oposto do que se acreditava, em uma associação direta da presença da coagulase com a produção de EE, nesse trabalho, a Tnase foi considerada como o melhor marcador de potencial enterotoxigênico das amostras, embora algumas delas fossem negativas para Tnase e coagulase e ainda assim produziram enterotoxinas.

Em fazendas leiteiras no estado de São Paulo, *Staphylococcus* spp. foram isolados de 63 (22,5%) amostras de leite de vacas saudáveis e de 80 amostras (27,4%) de vacas com mastite subclínica. A presença de *Staphylococcus aureus* foi significativamente diferente entre estes dois grupos e foi mais prevalente nas vacas com mastite. A presença de *Staphylococcus saprophyticus* também foi significativamente diferente entre estes dois grupos, mas este micro-organismo foi mais prevalente em vacas saudáveis. O gene *sea* foi mais prevalente em ambos os grupos. Oito de 15 amostras (53,3%) de *S. aureus* possuíam este gene e todos foram capazes de produzir a toxina *in vitro*. Dentro do grupo de SCN, 61 amostras das 128 (47,5%) possuíam o mesmo gene. Entretanto, apenas uma amostra (0,8%) de *Staphylococcus epidermidis* produziu a enterotoxina *in vitro* (Rall *et al.*, 2014).

De 623 amostras de SCP isoladas de queijo suíço elaborado a partir de leite cru, 609 foram identificadas como *Staphylococcus aureus*. O genótipo B de *S. aureus* (GTB), conhecido por sua alta contagiosidade e patogenicidade nos rebanhos suíços com mastite, foi o subtipo mais

abundante. Um subconjunto de 107 amostras de *S. aureus* de diferentes genótipos foi analisado quanto à presença de genes codificadores de EE, sendo o gene *sed* o mais frequentemente detectado. Quase todas as amostras de GTB continham os genes *sed*, *sej* e *ser*, sendo que metade delas, adicionalmente, transportavam *sea*. A produção de EE *in vitro* foi consistente com os genes das EE detectados na maioria dos casos. Entretanto, algumas amostras de GTBs não produziram EEA (Hummerjohann *et al.* 2014).

Em trabalho realizado por Martins *et al.* (2014), 104 produtos lácteos (24 sorvetes caseiros, 20 cremes de leite, 20 patês de queijo, 20 queijos “Minas” semi-curado e 20 queijos “Minas” frescos) obtidos da cidade de Campinas, São Paulo, foram analisados quanto a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus* coagulase positivo. Além disso, estudou-se a presença de genes codificadores das EE nas amostras isoladas de *Staphylococcus* spp., bem como avaliou-se a produção *in vitro* das EE clássicas por estas amostras. A contagem média de *Staphylococcus* spp. em diferentes grupos de alimentos variou de 3,7 a 6,15 log UFC/g. Entre as amostras estafilocócicas, 74,3% (110/148) foram identificadas como SCP e 25,7% (38/148) como SCN. De 111 amostras selecionadas, apenas uma (0,9%), identificada como *Staphylococcus aureus*, produziu enterotoxina, sendo que esta amostra foi isolada de queijo “Minas” semi-curado, na contagem de 6,28 log UFC/g.

Em trabalho realizado com amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos artesanais, elaborados a partir de leite cru de ovelha, na Itália, *sec* e *sel* foram os genes mais frequentemente isolados (Spanu *et al.*, 2012). Em queijo venezuelano artesanal telita, branco, fresco, elaborado a partir de leite cru, enterotoxinas A e B foram detectadas somente nos queijos armazenados a 25°C com contagens médias de *Staphylococcus aureus* de 10<sup>7</sup> UFC/g (Lucci *et al.*, 2014).

Em propriedades leiteiras localizadas em Minas Gerais, 51 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabra foram selecionadas e testadas por PCR para a presença de genes codificadores de enterotoxinas clássicas. Apenas três amostras foram negativas para todos os

genes pesquisados, sendo o genótipo *sec/see* o mais frequente (n = 16), seguido por *sea/sec/see* (n = 13) e *sec* (n = 13). O gene *sed* não foi detectado (Cavicchioli *et al.*, 2015).

### 3.1.2. Papel do biofilme de *Staphylococcus aureus* nas matrizes alimentares

A produção de biofilme representa um importante fator de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* associado à sua permanência no ambiente de processamento de alimentos (Gustafson *et al.*, 2014). Entretanto, embora a formação de biofilmes seja amplamente estudada sob o aspecto clínico, como em implantes e materiais médicos, poucos estudos têm sido relatados, até agora, sobre a ocorrência deste evento associado aos alimentos (Santos *et al.*, 2014; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2014; Di Ciccio *et al.*, 2015). Na indústria alimentar, conhecer as condições em que *Staphylococcus aureus* crescem e se aderem às superfícies para formar biofilmes é de grande importância, tendo em vista a ocorrência da contaminação de produtos alimentares e a possibilidade de produção de enterotoxinas por amostras enterotoxigênicas.

Em trabalho realizado por Oniciuc *et al.* (2016), 16 amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de alimentos (oito de produtos lácteos, cinco de peixe e três de carne) foram avaliadas em relação à capacidade de formação de biofilmes. Desse total, seis se destacaram por serem formadoras potentes de biofilme. Souza *et al.* (2014), em trabalho realizado com amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de superfícies de serviços alimentares, observaram que as amostras testadas apresentavam alta capacidade de aderência em superfícies de aço inoxidável e polipropileno, em ambas as temperaturas de incubação testadas (7°C e 28°C). Além disso, o uso dos desinfetantes ácido peracético e hipoclorito de sódio não foi eficiente na remoção completa das células de *S. aureus* aderidas às duas superfícies testadas. Na mesma linha de pesquisa, Di Ciccio *et al.* (2015), avaliando a capacidade de formação de biofilmes em superfície de poliestireno e aço inoxidável por amostras de *S. aureus* isoladas de alimentos, ambientes de processamento de alimentos e manipuladores de alimentos, observaram que, em um total de 67 amostras analisadas, 25 delas (25/38=65,7%) foram produtoras de biofilme em poliestireno,



enquanto 24 (24/38 =63,1%) foram produtores de biofilme em aço inoxidável. A maioria das amostras de *S. aureus* que produziram biofilmes (17/38 = 44,7%) foram isoladas de ambientes alimentares.

A formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* representa uma vantagem evolutiva ao micro-organismo, tendo em vista que na forma de células sésseis, aderidas em biofilmes, as bactérias resistem melhor às condições desfavoráveis do ambiente, como tratamentos com agentes antimicrobianos e sanitizantes, dessecação e radiação ultravioleta (Fux *et al.*, 2004). De forma conceitual, um biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células bacterianas protegida por uma matriz polissacarídica ou protéica, produzida pelo próprio micro-organismo, e aderente tanto a superfícies bióticas quanto abióticas (Simões *et al.*, 2010).

A estruturação de um biofilme é um processo que envolve, basicamente, quatro fases principais, sendo denominadas de fase de adesão, agregação, maturação e dispersão. Estas fases envolvem eventos que são fisiologicamente diferentes entre si e requerem fatores de patogenicidade específicos, que serão discutidos posteriormente (O'Toole *et al.*, 2000; Otto, 2013).

A primeira etapa de formação do biofilme é caracterizada pela adesão das bactérias planctônicas, ou seja, de vida livre a uma superfície. Esta primeira adesão é considerada reversível e é mantida por interações físico-químicas não específicas, sobretudo eletrostáticas e hidrofóbicas, como as interações de Van der Waals, que constituem o alicerce para o crescimento do biofilme (Ziebuhr *et al.*, 2000). Nessa fase, *Staphylococcus* spp. produzem algumas adesinas que auxiliam na sua ligação à superfície do ambiente alimentar ou do próprio alimento, como as fímbrias SSP-1 e SSP-2 e as autolisinas Atle (*Staphylococcus epidermidis*), Atl (*S. aureus*) e AAe (Fitzpatrick *et al.*, 2005). A autolisina Atle, em *Staphylococcus epidermidis*, codificada pelo gene *atle*, tem capacidade de se ligar diretamente às superfícies inertes poliméricas, por mecanismos ainda não elucidados. Mas, sabe-se que amostras mutantes deste gene apresentam reduzida aderência primária ao poliestireno e reduzida hidrofobicidade. Provavelmente, por este motivo,

estas amostras não formam biofilme no poliestireno, demonstrando redução na patogenicidade (Takahashi *et al.*, 2002).

Nos casos de biofilmes formados nas infecções animais e humanas, na fase primária de adesão, *Staphylococcus aureus* ainda expressa dezenas dos chamados MSCRAMM (componentes de superfície microbiana reconhecedoras de moléculas da matriz adesiva), que são proteínas de superfície usadas pelas bactérias para interagirem com moléculas da matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro, como a fibronectina, elastina e colágeno (Otto, 2008). *S. aureus* pode expressar até 21 diferentes MSCRAMM, sendo as mais estudadas: proteína A (*spa*), proteínas ligadoras de fibronectina (*fnbpa* e *fnbpb*), proteínas ligadoras de fibrinogênio (fatores *clumping* A e B e a proteína ligadora de fibrinogênio *fib*), proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*) e a proteína ligadora à elastina (gene *ebpS*) (Simojoki *et al.*, 2012; Geoghegan *et al.*, 2013; Scali *et al.*, 2015).

A segunda fase da adesão ao biofilme consiste na transição do estágio reversível para o irreversível, chamada fase de agregação. Nesse momento, as bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Em *Staphylococcus aureus* a principal molécula responsável na adesão intercelular é a adesina intercelular polissacarídica (PIA), que também é chamada de Poli-N-acetilglucosamina (PNAG), de acordo com a sua composição química (Mack *et al.* 1996). PIA é um polímero parcialmente desacetilado de N-acetilglucosamina que, junto com outros polímeros, tais como os ácidos teicóicos, as proteínas e o DNA extracelular (eDNA), constituem a maior parte da matriz extracelular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme (Groos *et al.*, 2001; Joo e Otto, 2012). A biossíntese de PIA é realizada por genes contidos no *locus ica*, que compreendem uma transferase N-acetilglucosamina (*icaA* e *icaD*), uma desacetilase de PIA (*icaB*), um exportador de PIA (*icaC*) e um gene regulador (*icaR*) (Heilmann *et al.*, 1996, Gerke *et al.*, 1998, Vuong *et al.*, 2004).

Embora PIA represente certamente um mecanismo principal de formação de biofilmes em *Staphylococcus aureus*, algumas amostras deste micro-organismo formam biofilmes utilizando

mecanismos independentes de PIA, por meio da expressão de proteínas adesivas (Rohde *et al.* 2005). Uma das proteínas mais importantes envolvida na formação de biofilmes independentes de PIA é a proteína de 140 kDa associada à acumulação, Aap (*accumulation-associated protein*), codificada pelo gene *aap*, (Rohde *et al.*, 2005). Em trabalho realizado com amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de cateter venoso central, a ausência dos genes *icaA* e *icaD* e a presença do gene *aap*, em três amostras produtores de biofilme, sugeriu a presença de um mecanismo alternativo de formação de biofilme, envolvendo a proteína Aap, que poderia substituir funcionalmente PIA como uma adesina intercelular (Lazzarotto, 2010).

Outra proteína que desempenha um papel importante na formação de biofilme, em um mecanismo independente de ICA, é a proteína de superfície ligada à parede celular de *Staphylococcus aureus*, chamada de Bap (proteína associada a biofilme). Bap foi inicialmente descrita em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite, e há evidências do papel de Bap durante a infecção de glândulas mamárias bovinas (Valle *et al.*, 2012; Speziale *et al.*, 2014). Em infecções humanas, ela parece desempenhar um papel predominantemente em infecções causadas por espécies de SCN, sendo que o seu gene codificador, *bap*, foi identificado em *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus xylosus* (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005).

Na fase de maturação, os biofilmes apresentam uma estrutura tridimensional semelhante a “cogumelos” ou “torres”, que são envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares, e por poros e canais de água, que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos entre as camadas superficiais e profundas do biofilme (Costerton *et al.*, 1999). Relacionado a esse fato, as modulinas solúveis em fenol (PSM) produzidas por *Staphylococcus aureus*, durante a fase de maturação do biofilme, têm sido associadas à formação dos poros supramencionados. De fato, as PSM parecem desempenhar um papel importante na estruturação dos biofilmes. Especificamente, a ausência de PSM, em mutantes de *S. aureus* com deleção do gene *psm*, levou a uma fraca formação de poros em um biofilme, à abolição das ondas características de desprendimento e rebrotação de biofilme e à perda de controle da expansão do

biofilme. Em contraste, a expressão induzida do *locus psm* em biofilmes pré-formados promoveu esses processos (Periasamy *et al.*, 2012).

Por fim, tem-se início a última fase da formação do biofilme, a fase de dispersão, que ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção. Nessa fase, há o desprendimento de agregados celulares ou células planctônicas por ruptura das forças adesivas intercelulares. Trabalhos anteriores têm atribuído às proteases, às nucleases e às PSM, os papéis de agentes de ruptura destas forças (Boles e Horswill, 2008; Mann *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Periasamy *et al.*, 2012). No entanto, destas moléculas efetoras propostas, até o presente momento, apenas as PSM foram efetivamente comprovadas como facilitadoras da maturação e dispersão de biofilmes estafilocócicos, por meio de modelos *in vitro* e *in vivo* (Otto, 2013). Uma vez desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, disseminando-se no ambiente de processamento do alimento e reiniciando a formação de novos biofilmes (Otto, 2008; Otto, 2013). Em *Staphylococcus aureus*, a regulação destes mecanismos ocorre por um sistema de detecção de *quorum sensing*, discutido mais adiante.

### **3.1.3. Papel do mecanismo de adaptação de *Staphylococcus aureus* nas matrizes alimentares**

A sobrevivência de *Staphylococcus aureus* no alimento ou nas plantas de processamento de alimento se inicia, frequentemente, com a formação de biofilme, como já discutido anteriormente. Um microambiente sem biofilme pode ser heterogêneo, no qual as bactérias competem por espaço, com limitação nutricional, e ficam sujeitas à dessecação, à exposição aos agentes químicos tóxicos e à radiação UV, como os utilizados dentro da indústria alimentícia, e às mudanças de pH, temperatura e concentrações de oxigênio. No ambiente do biofilme, portanto, os micro-organismos encontram proteção e estabilidade (Otto, 2013). Assim, a formação de biofilme apresenta-se como uma estratégia importante para a sobrevivência do micro-organismo em ambiente hostil.

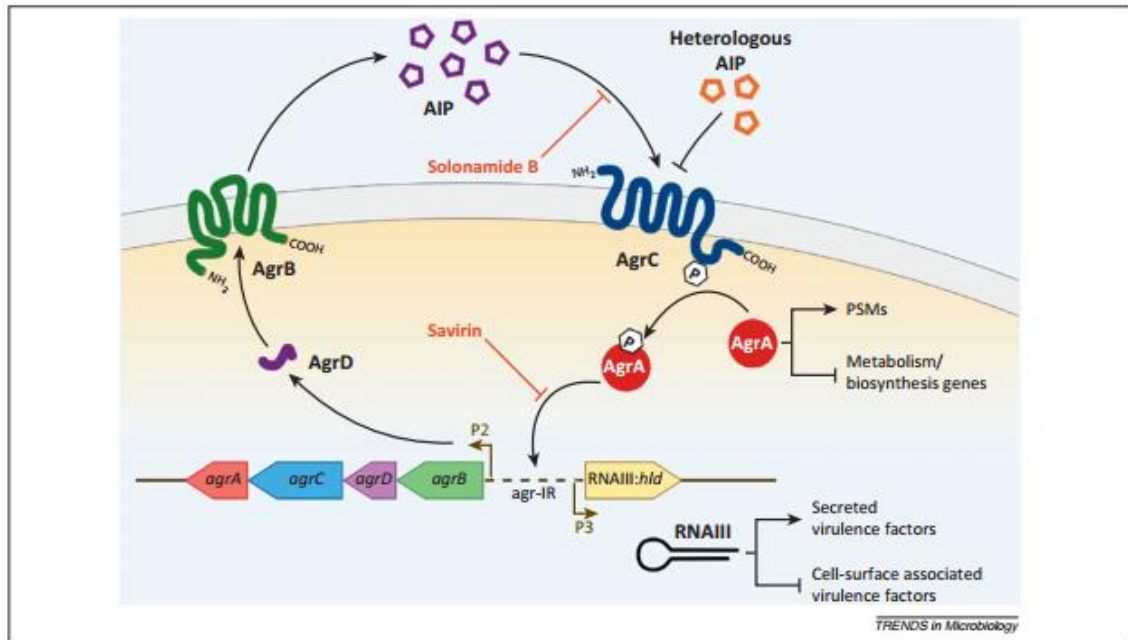
Entretanto, uma vez presente no alimento, *Staphylococcus aureus* devem se adaptar rapidamente às mudanças no seu ambiente, para que possam aumentar a sua taxa de sobrevivência e, assim, encontrarem condições favoráveis à produção de enterotoxinas. Assim como em outras bactérias, esta adaptação é mediada por meio de uma rede complexa de proteínas, de RNAs e de moléculas de detecção de *quorum sensing* (Morrison e Dunman, 2011).

Em *Staphylococcus aureus*, o principal sistema regulador da interação de quórum *sensing* é o *locus agr* (Morrison e Dunman, 2011). Este é um sistema de transdução de sinal, característico do gênero *Staphylococcus*, que permite a modulação da expressão de diversos genes, de acordo com a densidade celular (Bai e Rai, 2011). Ele foi inicialmente descrito após a inserção de um *transposon* (*Tn551*), no *locus agr*, resultando em redução na produção de toxinas e enzimas e, em contrapartida, em aumento nas proteínas associadas à parede celular de *Staphylococcus aureus* (Recsei *et al.*, 1986).

Hoje, sabe-se que o sistema Agr apresenta duas ações principais na regulação dos fatores de patogenicidade neste micro-organismo. De forma geral, atua estimulando a produção de proteínas extracelulares, como a alfa-toxina, beta-hemolisina, TSST-1 e as leucotoxinas, e inibindo as proteínas associadas à parede celular, como a proteína A, a coagulase e a proteína de ligação a fibronectina (Queck *et al.*, 2008). Dunman *et al.* (2001) identificaram 104 genes que são regulados positivamente e outros 34 que são regulados negativamente pelo sistema Agr.

O *locus agr* é composto por duas unidades de transcrição, que apresentam dois promotores distintos, o P2 e o P3 (figura 1). A unidade P2 contém quatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, responsáveis pela transcrição do RNA II e pela ativação da unidade de transcrição P3. Os genes *agrA* e *agrC* compõem o sistema de regulação de dois componentes do *locus agr*, sendo que o gene *agrA* codifica a proteína AgrA (34kDa), que funciona como um regulador citoplasmático. O *agrC* codifica a proteína transmembrana AgrC (46kDa), que atua como um receptor de histidina quinase. Já os genes *agrB* e *agrD* codificam, respectivamente, uma proteína integral de membrana e um propeptídeo, e são responsáveis pela síntese do peptídeo autoindutor (AIP), uma molécula composta por cinco a sete aminoácidos que sensibiliza o sistema Agr. A unidade P3, por sua vez,

contém apenas o gene *hld*, que codifica a delta-hemolisina e que não está envolvido no mecanismo de regulação dos fatores de patogenicidade do *agr*, e o RNA III, um transcrito parcialmente traduzido que é a molécula efetora do *locus agr* (Novick e Geisinger, 2008; Queck *et al.*, 2008).



Fonte: Painter *et al.*, 2014

Figura 1. Sistema de *quorum sensing* Agr.

Durante a fase de crescimento pós-exponencial de *Staphylococcus aureus*, o gene *agrD* codifica um protopeptídeo (*agrD*) que, maturado após digestões proteolíticas, é secretado para o meio extracelular na forma de um AIP. Este processo é realizado pela proteína *agrB*, ancorada a membrana celular, que contém seis segmentos transmembrânicos. De acordo com a densidade celular, em um mecanismo de *quorum sensing*, as concentrações de AIP no meio extracelular, após atingirem um determinado limiar, ativam o *locus agr*. Em seguida, a proteína transmembrana *AgrC* se liga ao AIP, por meio de receptores, desencadeando uma cascata de acontecimentos que resultam na fosforilação do resíduo de histidina quinase presente na sua extremidade C-terminal. O grupo fosfato é, então, transferido da proteína *AgrC* para o resíduo de aspartato presente na proteína citoplasmática *AgrA*. Esta fosforilação da proteína *AgrA* ocasiona alterações em sua conformação que permitem tanto a sua ligação em uma região intergênica (*Agr-IR*), entre os

promotores P2 e P3 do *locus agr*, quanto a sua interação com outros fatores, que serão discutidos posteriormente (figura 1) (Novick e Geisinger, 2008; Queck *et al.*, 2008).

A ligação de AgrA à Agr-IR regula positivamente a expressão dos promotores P2 e P3 levando, assim, ao estímulo da transcrição de RNA II e RNA III, respectivamente. O RNA II é um RNAm policistrônico que transcreve os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, enquanto que o RNAIII, além de transcrever o gene da delta-hemolisina, regula a transcrição de alguns genes de patogenicidade de importância em *Staphylococcus aureus*. Desta forma, embora a delta-hemolisina não esteja envolvida na regulação de genes de patogenicidade, a sua expressão tem sido usada para a avaliação qualitativa da expressão de RNAIII e, conseqüentemente, da ativação do *locus agr*, pois a produção e a detecção de delta-hemolisina indicam que RNAIII foi traduzido (Sakoulas, 2006).

De acordo com um polimorfismo na sequência do AIP e na de seu receptor AgrC, na região gênica hipervariável *AgrB-AgrC-AgrD*, tem-se quatro grupos alélicos de *agr* (I, II, III e IV), cada qual responsável por codificar uma molécula de AIP distinta. O AIP se liga de forma específica ao seu sensor correspondente de AgrC, de forma que heterólogos deste AIP (qualquer uma das outras três variantes alélicas de *agr*) não sejam capazes de se ligarem a um sensor AgrC não correspondente (figura 1). Desta forma, a ligação de um heterólogo de AIP leva a uma torção da estrutura helicoidal de AgrC que impede a atividade da histidina quinase e, conseqüentemente, a ativação do *locus agr* (Wang *et al.*, 2014a; Wang *et al.*, 2014b). A ligação de AIP no seu receptor AgrC ainda é alvo de uma molécula anti-*quorum sensing* denominada *Solonamide B* (figura 1), que impede a ativação de AgrC em todas as variantes alélicas de *agr*, inibindo a expressão do gene de patogenicidade por meio da ativação do *locus agr* (Nielsen *et al.*, 2014). Adicionalmente, a interação entre *agrA* e Agr-IR também parece possuir um inibidor em *Staphylococcus spp.* Corroborando este fato, um estudo recente identificou uma molécula pequena, denominada *Savirin* (Inibidor da patogenicidade de *Staphylococcus aureus*) (figura 1), capaz de inibir a ligação entre AgrA e Agr-IR e, conseqüentemente, a expressão dos fatores de patogenicidade associados ao AgrA (Sully *et al.*, 2014).

Em relação à participação do sistema Agr na formação e estabilização de um biofilme, sabe-se que amostras que expressam baixos níveis de *agr* têm maior capacidade de formação de biofilmes, uma vez que *agr* regula negativamente os fatores associados à formação de biofilme, como as proteínas de ligação à fibronectina A e B e a proteína vitronectina (Arvidson e Tegmark, 2001). Além disso, o sistema Agr regula positivamente os fatores relacionados à lise do biofilme, como as serinas proteases e as PSM polimerizadas (Queck *et al.*, 2008). Desta forma, para que *Staphylococcus* spp. possam contaminar um alimento e nele sobreviverem sob a forma de biofilme, há redução da expressão de *agr* na fase inicial de seu crescimento celular, quando a densidade celular ainda é baixa, com baixa transcrição de RNA II e RNA III. Isto significa que o micro-organismo apresentará um fenótipo de alta adesão celular, devido à maior expressão de proteínas da superfície celular. É o que ocorre também nos processos infecciosos, como as bacteremias, em que a atividade de *agr* é reprimida em detrimento da permanência do micro-organismo na corrente sanguínea (Butterfield *et al.*, 2011; Schweizer *et al.*, 2011; Viedma *et al.*, 2013). Por outro lado, o sistema Agr atua estimulando a produção de proteínas extracelulares, como a alfa-toxina, beta-hemolisina, TSST-1, as leucotoxinas e algumas enterotoxinas. Segundo Zhang *et al.* (1998) e Arvidson e Tegmark (2001), as expressões das enterotoxinas B, C e D são reguladas positivamente pelo *locus agr*. Por outro lado, a expressão da enterotoxina A é controlada de forma independente de *agr*. Quanto as demais enterotoxinas, ainda não há estudos que as correlacionam à modulação por este *locus*. Assim, uma vez já aderido alimento e diante de uma alta densidade celular, na fase de crescimento exponencial, tem-se um aumento da concentração de AIP, no meio extracelular, e consequente ativação do *locus agr*. Nesse caso, há maior transcrição de RNA II e RNA III que determina a maior produção de toxinas e enzimas extracelulares (Roux *et al.*, 2014). Esta ativação limita a formação do biofilme, fato que atua na dispersão do micro-organismo de um biofilme estabelecido. Adicionalmente, a bactéria estimula a produção de enterotoxinas no alimento e, uma vez ingeridas, podem ser responsáveis pelo quadro de intoxicação alimentar no homem (Kong *et al.*, 2006; Yarwood *et al.*, 2007; Boles e Horswill, 2008).



O locus *agr* tem sido foco de estudos que buscam elucidar os mecanismos envolvidos na expressão das enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. em alimentos. Nesse sentido, Even *et al.* (2009) propuseram que *Lactococcus lactis*, uma bactéria do ácido lático (BAL) amplamente utilizada na indústria de laticínios, é capaz de modular a expressão de enterotoxinas em amostras de *Staphylococcus aureus*, em um mecanismo envolvendo o locus *agr*. Eles observaram que quando estes dois micro-organismos foram cultivados em um mesmo meio de cultura, as amostras de *Staphylococcus aureus*, após realização de PCR em tempo real, expressaram uma menor quantidade de RNA III se comparadas a expressão dessas amostras cultivadas isoladamente. Ainda nesse trabalho, os autores não observaram a redução da expressão de RNA III quando as amostras de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas apenas com o sobrenadante de *Lactococcus lactis*, sugerindo que a redução da expressão do locus *agr*, por esta BAL, não depende da liberação de uma molécula inibidora ou, alternativamente, que a molécula inibitória é lábil. Por fim, os autores concluíram que a inibição da expressão do locus *agr* pela amostra de *Lactococcus lactis* deve ter ocorrido por um mecanismo dependente de SarA, um outro fator regulatório da patogenicidade de *Staphylococcus aureus*. Eles chegaram a esta suposição após observarem que quando a amostra de *Staphylococcus aureus* foi crescida no mesmo meio que o *Lactococcus lactis*, houve, também, menor expressão do gene *sarA* se comparada à expressão deste gene em amostras crescidas isoladamente no meio. Sendo o SarA um regulador positivo do locus *agr*, sua menor expressão poderia explicar a indução mais fraca da expressão do locus *agr* pelas amostras de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, mais estudos são necessários para a comprovação desta hipótese.

Além do Agr, outros sistemas reguladores da expressão de genes de patogenicidade em *Staphylococcus* spp., como SarA, sigma  $\beta$  e LytSR, atuam em uma rede complexa de ativação e inibição dos fatores de patogenicidade associados, por exemplo, à formação e à ruptura do biofilme (figura 2).



analisadas, 20 continham genes codificadores de EE, e a maioria dessas produziu a EE *in vitro*. Os genes mais frequentemente encontrados nas amostras foram *sea* e *seb*. Entre as amostras de *Staphylococcus* coagula negativo, cinco continham genes codificadores de EE e produziram a enterotoxina em ensaio imunoenzimático. Nesse trabalho, os autores concluíram que as amostras *Staphylococcus* coagulase negativo e aquelas de *Staphylococcus* coagulase positivo isoladas dos produtos lácteos eram capazes de enterotoxigenicidade genotípica e fenotípica. Além disso, reforçaram a importância da PCR como um método sensível e específico para o rastreamento de amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de um surto, independentemente da expressão da coagulase.

Em julho de 1987, na cidade de Ouro Preto (MG), houve um surto de intoxicação alimentar envolvendo quatro pessoas de uma mesma família. Tal evento foi atribuído à contaminação do queijo Minas frescal por *S. aureus* em contagem de  $9,3 \times 10^7$  UFC/g, no qual foram detectadas bactérias produtoras de EEA, EEB, EED e EEE. Entre os sintomas apresentados pela família, incluíram-se náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais (Sabioni *et al.*, 1988). Mais tarde, entre novembro de 1991 e outubro de 1992, em Minas Gerais, foram relatados mais cinco surtos de intoxicação estafilocócica associados, novamente, ao consumo de queijo frescal (Câmara, 2002).

Em 1999, os serviços sanitários do Conselho de Saúde de Manhuaçu foram notificados de um surto de intoxicação alimentar envolvendo 50 pessoas que adoeceram depois de comerem queijo Minas artesanal. Os sintomas de intoxicação alimentar (diarreia, vômitos, tonturas, calafrios e dores de cabeça) apareceram após 2 h dos indivíduos ingerirem o alimento contaminado. As amostras de queijo analisadas apresentaram altas contagens de *S. aureus*, superiores a  $10^8$  UFC/g, ainda, a presença EEA, EEB e EEC (Carmo *et al.*, 2002). A manipulação inadequada do queijo durante as suas etapas de elaboração foi apontada como a causa principal da contaminação estafilocócica.

Um surto extensivo de intoxicação alimentar estafilocócica foi descrito no distrito de Kansai, no Japão. Aproximadamente 13.420 passaram mal (náusea, vômito, diarreia e dores abdominais),

após 24 h da ingestão de produtos lácteos, incluindo leite com baixo teor de gordura e uma bebida tipo iogurte, produzidos por uma fábrica na cidade de Osaka. O principal ingrediente destes produtos lácteos foi um leite em pó desnatado elaborado por uma fábrica em Hokkaido. A enterotoxina A foi detectada no leite com baixo teor de gordura, em concentrações menores ou iguais a 0,38 ng/ml, e no leite em pó desnatado, aproximadamente 3,7 ng/g. A ingestão total da EEA per capita foi estimada em aproximadamente 20 a 100 ng. Adicionalmente, os autores testaram a resistência térmica da EEA submetendo, pelo menos duas vezes, à pasteurização a 130°C durante 4 ou 2 segundos. Observou-se que a EEA manteve intacta tanto suas atividades imunológicas quanto as biológicas, embora tivesse sido parcialmente inativada. Este surto alertou para o risco de intoxicação alimentar associado ao consumo de produtos termicamente tratados, uma vez que sob altas temperaturas tem-se a morte do micro-organismo, mas não a inativação plena das EE por ele produzidas (Asao *et al.*, 2003).

No final de 2009, seis surtos de intoxicação alimentar causados por *Staphylococcus* spp. foram relatados na França. Queijo fresco elaborado com leite cru foi considerado a causa comum nos surtos. *Staphylococcus* produtor de EEE foi identificado e quantificado no queijo usando métodos oficiais e de confirmação do Laboratório de Referência da União Européia (EU-RL). Este foi o primeiro relato de surtos de intoxicação alimentar causada pela EEE na França (Ostyn *et al.*, 2010).

Em 1º de outubro de 2014, crianças e funcionários de um internato suíço consumiram um queijo fresco produzido a partir de leite cru. Dentro de aproximadamente 7 h, todas as 14 pessoas que ingeriram o queijo ficaram doentes, incluindo dez crianças e quatro membros da equipe. Os sintomas incluíram dor abdominal e vômito intenso, seguido de diarreia grave e febre. Neste caso, foram isoladas três amostras diferentes de *Staphylococcus aureus* produtoras de EEA e EED, em contagens superiores a 10<sup>6</sup> UFC/g. Por meio de estudo epidemiológico, constatou-se que a fonte de contaminação do queijo foi o leite cru (Sophia *et al.*, 2015).

#### 4. Resistencia a antimicrobianos

Um sério problema para a saúde pública associado à presença de *Staphylococcus aureus* no alimento é o desenvolvimento de micro-organismos multirresistentes na natureza (Luz, 2008). Uma vez que esta resistência antimicrobiana pode ser transmitida de uma bactéria a outra, por meio de elementos genéticos móveis, tem-se, em longo prazo, o aparecimento de bactérias cada vez mais multirresistentes.

A resistência aos antimicrobianos pelo gênero *Staphylococcus* está associada à existência de genes presentes no micro-organismo que codificam proteínas relacionadas a diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antibióticos. Os antimicrobianos beta-lactâmicos, por exemplo, agem inibindo as *Protein Binding Penicillins* (PBP's), proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular do micro-organismo. A resistência à beta lactâmicos está associada à alteração da proteína alvo de ação da droga, ou seja, das (PBP), de forma que há um impedimento à formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana (Mendonça 1997; Harbarth *et al.* 1998). Outro mecanismo associado à resistência á beta lactâmicos é a produção de enzimas inativadoras extracelulares, as betalactamases, que agem sobre o anel betalactâmico, provocando sua hidrólise e, conseqüente, inativação (Garino Júnior *et al.*, 2011).

A metilicina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos, lançada comercialmente no início da década de 1960 como tentativa de contornar a alta resistência de *Staphylococcus aureus* à penicilina. Cerca de um ano após o início de sua comercialização foi identificado o primeiro isolado clínico de MRSA (Jevons, 1961). A partir de então, relatos da identificação de amostras de MRS tornaram-se frequentes, inclusive sua disseminação em alimentos. A resistência de *Staphylococcus aureus* à metilicina se associa à presença do gene *mecA* contido no *Staphylococcus* Cassete Cromossomo (SCCmec), que são elementos genéticos móveis que mediam a modificação no sitio de ação dos betalactâmicos. Esse gene determina a codificação de uma PBP semelhante a PBP2a/PBP2' que possui reduzida afinidade aos betalactâmicos,

permitindo que *Staphylococcus* spp. mantenham sua biossíntese até em concentração consideradas inibitórias desses antimicrobianos (Livermore, 2000; Paterson *et al.*, 2014).

*Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) aparece, hoje, como o principal exemplo de resistência bacteriana no mundo, pelo fato de desencadear infecções graves que limitam as opções terapêuticas, prolongando, assim, o tempo de tratamento destas (Ibed e Hamim, 2014). Por muitos anos, amostras de MRSA foram reconhecidas como patógenos exclusivos de hospitais. Porém, estudos têm documentado a disseminação de MRSA em alimentos (Pesavento, *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2015).

Em estudo realizado nos mercados locais e nas aldeias da província de Dakahlia, no Egito, MRSA foi isolado de amostras de leite cru e de alguns produtos lácteos vendidos. A detecção do gene *mecA* ocorreu em cinco amostras de leite cru, queijo kariesh e sorvete. Mas, o gene não foi detectado em amostras da bactéria isolada de mãos coletadas dos manipuladores. Os autores concluíram, portanto, que o leite cru e seus derivados lácteos foram importantes fontes de transmissão de amostras MRSA dentro da comunidade estudada (Kamal *et al.*, 2013).

Fenotipicamente, a resistência à meticilina pode ser identificada por meio dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM). Em ambos, as drogas de eleição são a cefoxitina e/ou oxacilina (CLSI, 2008). Entretanto, a resistência fenotípica à oxacilina depende substancialmente da expressão do gene *mecA*, de forma que um micro-organismo pode carrear o *mecA* e não necessariamente expressar fenotipicamente sua resistência. Adicionalmente, estudos recentes apontam um gene homólogo ao *mecA* que estaria envolvido na resistência à meticilina em *S. aureus*, o gene *mecC* (Ito *et al.*, 2012). Desde a sua primeira descrição, têm aumentado a identificação de MRSA portadores do gene *mecC*, principalmente na Europa (Paterson *et al.*, 2014; Porrero *et al.*, 2014).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, L.D.; ROMANO, A.P.M.; NADER FILHO, A. *et al.* Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco a qualidade do leite e a saúde da glândula mamária. *Arq. Inst.Biol.*v.74, n.4, p.417- 421, 2005.
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciênc. Agrotec.* v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- ANDREY, D.O. *Molecular regulation of tst superantigen expression by global regulatory systems in Staphylococcus aureus.* 2011. 120f. Tese de Doutorado. University of Geneva. 2011.
- ANDREY, D. O., A. Jousselin, M. Villanueva, A. Renzoni, A. Monod, C. Barras, N. Rodriguez, W. Kelley. 2015. Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the Toxic Shock Tst Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10(8): e0135579.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; RAVAIOLI, S. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v. 5, n. p.7, 2015.
- ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins.* v. 2, p. 1751–73, 2010.
- ARVIDSON, S.; TEGMARK, K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol*, v. 291, n. 2, p.159-170, 2001.
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T. *et al.* An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.*, v. 130, n. 01, p.33-40, 2003.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* v.61, n.1, p.1-10, 2000.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically.* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H. *et al.* (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society Microbiology, Washington. p. 384-404, 2003.
- BEENKEN, K. E.; MRAK, L. N.; GRIFFIN, L. M. *et al.* Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p.e10790, 2010.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C. *et al.* PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence

for new variants of seG and seI in *S.aureus* AB-8802. *J. Appl. Microbiol.*, v. 97, n.4, p. 719-730, 2004.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 4, p.e1000052, 2008.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L. *et al.* *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *B. CEPPA*. v. 26, p.71-86, 2008.

BOUCHER, H.; MILLER, L. G.; RAZONABLE, R. R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 51, n. Supplement 2, p.S183-S197, 2010.

BROWN, A. F.; LEECH, J. M.; ROGERS, T. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.*, v. 4, n. p.507, 2014.

BUTTERFIELD, J. M.; TSUJI, B. T.; BROWN, J. *et al.* Predictors of agr dysfunction in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates among patients with MRSA bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, n. 12, p.5433-5437, 2011.

CÂMARA, S. A. V. *Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 – 2001*. 2002. 79 f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde) - Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Secretaria de Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobi. Agents Chemother.*, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CASTRO, R. D. *Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano*. 2015. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CAVICCHIOLI, V.; SCATAMBURLO, T.; YAMAZI, A. *et al.* Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 12, p.8386-8390, 2015.

CENCI-GOGA, B.T. KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V. *et al.* Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J. Food Protect.*, v.66, n.9, p.1693-1696, 2003.



CENTER FOR DISEASES CONTROL (US). 2000. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1993-1997 Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/briefing/foodborneDisease.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. *Cienc. Equat.*, v. 2, n. 1, p.1-14, 2012.

CHEN, T. R. CHIOU, C. S., TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.*, v.92, n.2 p.189-197, 2004.

CHEUNG, A. L.; KOOMEY, J. M.; BUTLER, C. A. *et al.* Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from agr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 89, n. 14, p. 6462-6466, 1992.

CHEUNG, A. L.; NISHINA, K.; MANNA, A. C. SarA of *Staphylococcus aureus* binds to the sarA promoter to regulate gene expression. *J. Bacteriol.*, v. 190, n. 6, p.2239-2243, 2008.

COSTA, W. L. R.; FERREIRA, J. S.; CARVALHO, J. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meats and prepared foods in public hospitals in Salvador, Bahia, Brazil. *J. Food Sci.* v.80, p. 147-50, 2015.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p.1318-1322, 1999.

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

CUCARELLA, C.; TORMO, M. Á.; UBEDA, C. *et al.* Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infec. Immun.*, v. 72, n. 4, p.2177-2185, 2004.

DELMAS, G.; SILVA, N.J.; PIHIER, N. *et al.* Les toxi-infections alimentaires collectives em France entre 2006 et 2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* v.31-32, p.344-348. 2010.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food control.*, v. 50, n. p.930-936, 2015.

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

DIVERS, T.J.; PEEK, S.F. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. 2. Ed. St. Louis: Saunders Elsevier Health Science, 2008, 686p.

DUNMAN, P. Á.; MURPHY, E.; HANEY, S. *et al.* Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agrand/or sarA Loci. *J. Bacteriol.*, v. 183, n. 24, p.7341-7353, 2001.

EVEN, S.; CHARLIER, C.; NOUAILLE, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 75, n. 13, p.4459-4472, 2009.

FEY, P. D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 13, n. 5, p.610-615, 2010.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.*, v.54, p. 509-10, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDCRAF, U. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo : Atheneu, 2003

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic 1 shock syndrome 2 toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled 3 foods: epidemiological and genetic findings. *Microb. Infect.*, v. 7, n.2, p. 187-194, 2005.

FUX, C.; WILSON, S.; STOODLEY, P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 14, p.4486-4491, 2004.

GEISINGER, E.; ADHIKARI, R. P.; JIN, R. *et al.* Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol. Microbiol.*, v. 61, n. 4, p.1038-1048, 2006.

GEOGHEGAN, J. A.; MONK, I. R.; O'GARA, J. P. *et al.* Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. *J. Bacteriol.*, v. 195, n. 11, p.2675-2683, 2013.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜBMUTH, R. *et al.* Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J. Biol Chem.*, v. 273, n. 29, p.18586-18593, 1998.

GUIMARÃES, F. F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V.B. *et al.* Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, v. 96, n. 5, p.2866-2872, 2013.

GUSTAFSON, J. E.; MUTHAIYAN, A.; DUPRE, J. M. *et al.* *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food control*. 2014.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C. *et al.* Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.*, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996,

HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 36, n. 4, p.815-836, 2012.

HENNEKINNE, J.-A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F. *et al.* How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*, v. 2, n. 8, p.2106-2116, 2010.

HUMMERJOHANN, J.; NASKOVA, A.; BAUMGARTNER, H.U. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese . *J. Dairy Sci.*, v. 97, n.3, p. 1305–1312, 2014

IBED, A.N.; HAMIM S.S. Molecular detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burns infection in Al-nasiriyah city. *World J. Pharm. Sci.* v.2, n.9, p. 950-954, 2014.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Estatística da Produção Pecuária- Setembro de 2016. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Pecuaria/Fasciculo\_Indicadores\_IBGE/abate-leite-couro-ovos\_201602caderno.pdf> Acessado em: 4 nov. 2016.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P; BEUCHAT, L. E.; MONTVILLE, E (Eds), *Food microbiology:fundamentals & frontiers* (2nd ed.), ASM Press, Washington DC.2001. p. 411-433.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J. *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infec. Immun.*, v. 70, n. 2, p.631-641, 2002.

JAY, J. M; LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. D. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 782 p.

JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.* v.19, p. 1503–1513, 2012.

KAMAL, R. M.; BAYOUMI, M. A.; ABD EL AAL, S. F. A. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control*. v.33, p. 49-53, 2013.

KONG, K. F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus quorum sensing* in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* v. 296, p. 133–139, 2006

LAZZAROTTO, C. *Formação de biofilme de Staphylococcus epidermidis isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos*. 75f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* v. 2, n.1, p. 63-76, 2003.

LEE, J. H.; LEE J. H.; KIM, M.S. *et al.* Analysis of foodborne disease outbreaks for improvement of food safety programs in Seoul, Republic of Korea, from 2002 to 2006. *J. Environ. Health.*, n.71, n.7, p.51-5, 2009.

- LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; *et al.* Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, n.1, p. 38-43, 2003.
- LI, J.-P.; ZHOU, H.-J.; YUAN, L. *et al.* Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, v. 10, n. 10, p.753-760, 2009.
- LUCCI, E.; BENAVIDES, C.; SPENCER, L. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y producción de enterotoxinas durante La manufactura y almacenamiento de queso “telita”. *Revista Científica. FCV-LUZ*, v.24, n.3. p- 205-212, 2014.
- LUZ, I. S. *Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco*. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE.
- MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A. *et al.* The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.*, v. 178, n. 1, p.175-183, 1996.
- MANNA, A. C.; BAYER, M. G.; CHEUNG, A. L. Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. v. 180, n. 15, p. 3828-3836, 1998.
- MANNA, A. C.; CHEUNG, A. L. sarU, a sarA homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 1, p.343-353, 2003.
- MANNA, A. C.; CHEUNG, A. L. Transcriptional regulation of the agr locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, v. 60, n. 5, p.1289-1301, 2006.
- MANNA, A. C.; INGAVALE, S. S.; MALONEY, M. *et al.* Identification of sarV (SA2062), a new transcriptional regulator, is repressed by SarA and MgrA (SA0641) and involved in the regulation of autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 16, p.5267-5280, 2004.
- MARTIN, M.C.; FUEYO, J.M.; GONZALEZ-HEVIA, M.A. *et al.* Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* v.94, n.3, p.279– 286, 2004.
- MARTINS, I. M.; KABUKI, D. Y.; MIYA, N. T. N. *et al.* Occurrence and Characterization of Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus* Isolated from Dairy Products. *J. Food Saf.*, v. 34, n. 3, p.185-192, 2014.
- MORRISON, J.M.; DUNMAN, P.M. The modulation of *Staphylococcus aureus* mRNA turnover. *Future Microbiol.*, v. 6, n. 10, p. 1141-1150, 2011.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI. *et al.* *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

NEMA, V., AGRAWAL, R., KAMBOJ, D.V. *et al.* Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *Int. J. Food Microbiol.* v.117, n.1, p.29-35, 2007.

NIELSEN, A.; MÅNSSON, M.; BOJER, M. S. *et al.* Solonamide B inhibits quorum sensing and reduces *Staphylococcus aureus* mediated killing of human neutrophils. *PLoS One*, v. 9, n. 1, p.e84992, 2014.

NOVICK, R. P.; JIANG, D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology*, v. 149, n. 10, p.2709-2717, 2003.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.*, v. 42, p. 541-564, 2008.

NUNES, R. S. C.; DE SOUZA, C. P.; PEREIRA, K. S. *et al.* Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 4, p.2641-2653, 2016.

OLIVEIRA, A. M.; PADOVANI, C. R.; MIYA, N. T. N. *et al.* High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. *Food. Pathog. Dis.*, v. 8, n. 1, p.159-163, 2011.

OLIVEIRA, C.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. *et al.* Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v. 121, n. 3, p.297-305, 2015.

OLIVEIRA, C.; JÚNIOR, W.L.; QUEIROGA, R. *et al.* Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. *J.Dairy Sci.*, v. 94, n. 6, p.3166-3175, 2011a.

OLIVEIRA, C.; TIAO, N.; SOUSA, F. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. *Zoonoses and public health*, v.63, p.97-105, 2016.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet.Bras.* v.31, n.2, p.104-110. 2011b.

OLIVEIRA, T.M.B.F.; SOUZA, L.S.; CASTRO, S.S.L. Dinâmica da série nitrogenada nas águas da bacia hidrográfica Apodi/Mossoró - RN - Brasil. *Revista Eclética Química*. v. 34, n. 3, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/eq/v34n3/02.pdf>>. Acessado em: 15 nov. 2016.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 246, n.2, p. 191-198, 2005.

ONICIUC, E.-A.; CERCA, N.; NICOLAU, A. I. Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Front. Microbiol.*, v. 7, n. 2016.

ORDEN, J. A.; GOYACHE, J; HERNÁNDEZ, J. *et al.* Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis systems for detect of staphylococcal enterotoxins in food extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.12, p. 4083-4085, 1992.

OSTYN, A., DE BUYSER, M. L., GUILLIER, F. *et al.* First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance*. v.15, n.13, p.1-4, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v.322, p. 207–228, 2008.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* v. 64, p. 175-188, 2013.

PAINTER, K. L.; KRISHNA, A.; WIGNESHWERARAJ, S. *et al.* What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends microbiol.*, v. 22, n. 12, p.676-685, 2014.

PERIASAMY, S.; JOO, H.-S.; DUONG, A. C. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 109, n. 4, p.1281-1286, 2012.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control.*, v. 18, n.3, p. 196–200, 2007.

PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S. *et al.* Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* v.163, p.34–40, 2013.

QUECK, S. Y.; JAMESON-LEE, M.; VILLARUZ, A. E. *et al.* RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell*, v. 32, n. 1, p.150-158, 2008.

RALL, V.; MIRANDA, E.; CASTILHO, I. *et al.* Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci*, v. 97, n. 2, p.829-837, 2014.

RECSEI, P.; KREISWIRTH, B.; O'REILLY, M. *et al.* Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. *Mol. Gen. Genet. MGG*, v. 202, n. 1, p.58-61, 1986.

ROHDE, H.; BURDELSKI, C.; BARTSCHT, K. *et al.* Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.*, v. 55, n. 6, p.1883-1895, 2005.

ROUX, A.; TODD, D. A.; VELÁZQUEZ, J. V. *et al.* CodY-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr system integrates nutritional and population density signals. *J. Bacteriol.*, v. 196, n. 6, p.1184-1196, 2014.

RUDKIN, J. K.; EDWARDS, A. M.; BOWDEN, M. G. *et al.* Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J. Infect. Dis.*, v. 205, n. 5, p.798-806, 2012.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev. de Saúde Públ.*, v. 22, 458-61, 1988.

SAKOULAS, G. The accessory gene regulator (agr) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Role in virulence and reduced susceptibility to glycopeptides antibiotics. *Infect. Dis.*, v. 3, n. 2, p. 287-294, 2006.

SANTOS, V. M.; MARTINS, H. B.; REZENDE, I. S. *et al.* Virulence factor profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk from Brazil. *Food Nutrit. Sci.*, v. 5, n. 15, p.1496, 2014.

SCALI, F.; CAMUSSONE, C.; CALVINHO, L. *et al.* Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Res. Vet. Sci.*, v. 100, n. p.88-99, 2015.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; THORUP COHN, M. *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, v. 2, n. 6, p.580-592, 2011.

SCHROEDER, K.; JULARIC, M.; HORSBURGH, S. M. *et al.* Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS One*, v. 4, n. 10, p.e7567, 2009.

SCHWEIZER, M. L.; FURUNO, J. P.; SAKOULAS, G. *et al.* Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, n. 3, p.1082-1087, 2011.

SILVA, D.J. Resíduos na Indústria de Laticínios. (2011). Disponível em: <<http://www.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/saibaMais/saibaMais2.pdf>>. Acessado em: 4 nov. 2016.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci. Technol.*, v. 43, n. 4, p.573-583, 2010.

SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; FERRER, C. P. *et al.* Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet. Microbiol.*, v. 158, n. 3, p. 344-352, 2012.

SOPHIA, J.; DELPHINE, W.; CLAUDE, B. *et al.* Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* 2015.

SORIANO, J.M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.M. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trens in Food Sci. Tech.* v.13, n.2, p. 60-67, 2002.

SOUZA, E. L. D.; MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. D. M. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Braz. J. Microbiol.*, v. 45, n. 1, p.67-75, 2014.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. *et al.* Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

SOUZA, R.C. *Resíduos de antibiótico no leite*. 2006. 44 f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal). Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2006.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S. *et al.* Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* v.153, n. 1-2, p. 53–57, 2012

SPEZIALE, P.; PIETROCOLA, G.; FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A. Proteinbased biofilm matrices in Staphylococci. *Front. Cell Infect. Microbiol.* v.4, p. 171, 2014.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A. *et al.* Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Rev. Ciên. Tecnol. Aliment.* v.26, n.1, 2006.

STEVENS, D.L.; BRYANT, A.; HACKETT, S.P. Sepsis syndromes and toxic shock syndromes: concept in pathogenesis and perspective of future treatment strategies. *Curr. Opin. Infect Dis.* v.6, p.374-383, 1993.

SULLY, E. K.; MALACHOWA, N.; ELMORE, B. O. *et al.* Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog.*, v. 10, n. 6, p.e1004174, 2014.

TAKAHASHI, J.; KOMATSUZAWA, H.; YAMADA, S. *et al.* Molecular characterization of an atl null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.*, v. 46, n. 9, p.601-612, 2002.

TANG, J.; KANG, M.; CHEN, H. *et al.* The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. *Sci. China Life Sci.* v.54, n.9, p. 863–869, 2011.

TEGMARK, K.; KARLSSON, A.; ARVIDSON, S. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.*, v. 37, n. 2, p.398-409, 2001.

TORMO, M. A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F. *et al.* Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, v. 151, n. 7, p.2465-2475, 2005.

TORMO, M. A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F. *et al.* Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, v. 151, n. 7, p.2465-2475, 2005.

VALLE, J.; LATASA, C.; GIL, C. *et al.* Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog.*, v. 8, n. 8, p.e1002843, 2012.



VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S. *et al.* Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. *Food control.*, v. 39, n. p.8-16, 2014.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud pública de México*, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C. *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, v.12, n. 4, p. 410-415, 2008.

VIDEIRA, E.; SANZ, F.; ORELLANA, M. A. *et al.* Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 69, n. 1, p.51-58, 2014.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M. *et al.* A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 52, p.54881-54886, 2004.

WANG, B.; ZHAO, A.; NOVICK, R. P. *et al.* Activation and inhibition of the receptor histidine kinase AgrC occurs through opposite helical transduction motions. *Mol. cell*, v. 53, n. 6, p.929-940, 2014a.

WANG, L.; QUAN, C.; XIONG, W. *et al.* New insight into transmembrane topology of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1838, n. 3, p.988-993, 2014b.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 121, n. 1, p.238-248, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. *World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>>. Acessado: 10 nov. 2016.

YARWOOD, J. M.; PAQUETTE, K.M.; TIKH, I. B. *et al.* Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* v. 22, p. 7961–7967, 2007.

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

ZIEBUHR, W.; LÖSSNER, I.; RACHID, S. *et al.* Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 485, p. 151-7, 2000.

ZOCHE, F. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: pcr para detecção em queijo minas frescal e caracterização do agrupamento *egc* em isolados obtidos em alimentos de origem animal.

2008. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, RS.

## **Capítulo 2**

**Fatores de patogenicidade e perfil de resistência a antimicrobianos em  
*Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento,  
manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das  
Vertentes, Brasil**

## 1- INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) produzido na região de Campo das Vertentes é um dos queijos feitos com leite cru mais populares e consumidos no Brasil. Falhas no controle da sanidade do rebanho e na aplicação de práticas higiênico-sanitárias durante a elaboração do produto podem levar a altas contagens de *Staphylococcus aureus* no QMA (Martins *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus* tem sido descrito como um dos agentes causadores mais comuns de intoxicação alimentar associada ao consumo de queijo de leite cru no mundo (Carmo *et al.*, 2002; EFSA, 2010; Sophia *et al.*, 2015). A presença deste patógeno no produto final é multifatorial, mas comumente relacionada ao uso de leite cru e de soro-fermento contaminados na elaboração do queijo e à ocorrência de manipuladores portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* (Castro *et al.*, 2016; Baran *et al.*, 2017; Jöhler *et al.*, 2018)

*Staphylococcus aureus* tem potencial de causar uma variedade de doenças no homem e no animal (Boucher *et al.*, 2010; Fey, 2010). Este potencial é determinado pela presença ou ausência de genes no micro-organismo que codificam uma série de fatores de patogenicidade, em especial as exotoxinas como as enterotoxinas estafilocócicas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) e as hemolisinas (Brown *et al.*, 2014). A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis e pré-formadas no alimento desencadeia o quadro de intoxicação alimentar no homem, a qual representa a segunda ou a terceira maior causa de intoxicação alimentar no mundo. Com base em diferenças antigênicas, são descritas na literatura, até o presente momento, vinte e três EE. Entretanto, as denominadas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais comumente relacionadas a casos de intoxicação alimentar descritos na literatura (Ono *et al.*, 2015).

A produção de biofilme representa outro importante fator de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*, por contribuir para a colonização do agente nos tecidos celulares e em superfícies abióticas, além de criar uma barreira protetora à bactéria à ação de componentes do

sistema imune do hospedeiro e à ação de agentes antimicrobianos (Gustafson *et al.*, 2014). Em *Staphylococcus aureus*, a principal molécula responsável na adesão intercelular é a adesina intercelular polissacarídica (PIA), um polímero parcialmente desacetilado de N-acetilglicosamina (Joo e Otto, 2012). Sua biossíntese é realizada por genes contidos no *Operon ica* (cluster de genes *ica* ADBC) e estudos tem demonstrado a relação entre a presença do operon *ica* e a formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* de origem alimentar (Crantom *et al.* 1999; Melo *et al.* 2016).

Outro sério problema para a saúde pública associado à presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos é a resistência destes aos antimicrobianos, pelo fato de desencadear infecções graves que limitam as opções terapêuticas, prolongando, assim, o tempo de tratamento destas (Ibed e Hamim, 2014). *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) aparece, hoje, como o principal exemplo de resistência bacteriana no mundo (Ibed e Hamim, 2014). MRSA é caracterizado principalmente pela aquisição do gene *mecA*, que está localizado no cassete cromossomossômico *mec* (SCCmec) (Basset *et al.*, 2013). Por muitos anos, amostras MRSA foram reconhecidas como patógenos exclusivos de hospitais. Porém, estudos têm documentado a disseminação de MRSA em alimentos (Kamal *et al.*, 2013, Costa *et al.*, 2015; Jamali *et al.*, 2015).

A expressão gênica de alguns fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*, como as EE, TSST, hemolisina alfa e biofilme é controlada pelo sistema regulatório global *accessory gene regulator* (*agr*) (Novick *et al.*, 1993). Este é um sistema de transdução de sinal, característico do gênero *Staphylococcus*, e que permite a modulação da expressão de diversos genes em um mecanismo de *quorum sensing* (Morrison e Dunman, 2011). O Sistema *agr* é codificado pelo locus (*agr*) que controla a expressão da molécula de RNA (RNAIII). Uma vez que esta molécula atinge uma concentração crítica em determinado meio de acordo com a densidade celular, a expressão dos fatores de patogenicidade é inicializada (Nielsen *et al.*, 2014).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a genética, a produção *in vitro* de fatores de patogenicidade e o perfil de resistência antimicrobiana de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem

Foram utilizadas 76 amostras de *Staphylococcus aureus* previamente isoladas de leite cru (n=14), soro-fermento (n=5), manipuladores (n=15) e QMA (n=42) provenientes de nove propriedades rurais localizadas na região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, Brasil (Castro *et al.*, 2016). As amostras foram armazenadas em meio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Difco, Kansas, EUA*) e glicerol e submetidas ao congelamento (- 20°C), sendo conservadas desde então. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP-UFMG), protocolo CAAE: 79522917.6.0000.5149.

### 2.2. Caracterização fenotípica e identificação das amostras por MALDI- TOF MS

As amostras de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em Ágar BHI (*Difco*) seguido de incubação das placas em aerobiose a 37° C por 18/24h. As colônias crescidas foram submetidas à técnica de coloração de Gram para determinação da morfologia dos agentes bacterianos e a prova de produção da catalase (Carter, 1998). A partir dos cultivos em caldo BHI (*Difco*), as amostras foram submetidas às provas de coagulase livre e DNase, segundo Silva *et al.* (2010), e a fermentação do manitol segundo Bergey e Holt (1994). A confirmação da espécie das amostras foi realizada por análise proteômica pela técnica de *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) - *time of flight* (TOF) *mass spectrometry* (MS). Os espectros foram adquiridos usando o espectrômetro de massa FlexFlex MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) e registados no modo linear positivo dentro de uma faixa de massa de 2.000 a 20.000 Da. Os critérios de escore de identificação utilizados foram os recomendados pelo fabricante: escore  $\geq$

2.000 indica identificação ao nível de espécie, escore  $\geq 1.700$  e  $< 2.000$  indica identificação de gênero, e escore  $< 1.700$  indica identificação não confiável.

### **2.3. Detecção de genes de patogenicidade por PCR convencional**

O DNA bacteriano foi extraído de acordo com a metodologia anteriormente descrita (Pitcher *et al.*, 1989). DNA genômico foi então utilizado nas reações de amplificação por PCR para detectar os genes relacionados às enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), à toxina da síndrome do choque tóxico (*tsst-1*), à formação de biofilme (*icaA*, *icaB*, *icaC*), ao sistema de *quorum sensing* Agr (*agr*) e à resistência a meticilina (*mecA*) de acordo com metodologias descritas na literatura (Becker *et al.*, 1998; Reinoso *et al.*, 2004; Dias-Souza *et al.*, 2013; Breves *et al.*, 2015). Todas as reações foram feitas com Master Mix (Phoneutria®, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com a recomendação do fabricante.

### **2.4. Avaliação da expressão dos genes codificadores da produção das EE e TSST por qRT-PCR**

O RNA total das amostras que possuíam gene toxigênico na PCR foi obtido de colônia bacteriana, recém-cultivada em caldo BHI (*Difco*), incubado a 37°C por 20h, sob agitação mecânica (180rpm), por meio do kit *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen, California, USA*). A qualidade e a quantidade de amostras de RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose e também por meio de análise espectrofotométrica em NanoDrop 2000 espectrofotômetro (Thermo Scientific, Inc., Waltham, Estados Unidos). As amostras foram tratadas com Turbo DNase (Ambion, Austin, Estados Unidos) para síntese de cDNA, a qual foi realizada utilizando 1 µg de RNA total e kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) de acordo com as orientações de seu manual. A PCR quantitativa da transcrição reversa (qRT-PCR) foi realizada em termociclador 7500 Real-Time PCR System

(Applied Biosystems, California, EUA) e as análises foram avaliadas com o Sequence Detection software Version 2.4 (Applied Biosystems). A qRT-PCR foi realizada utilizando-se SYBR green PCR master mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) e primers específicos para os genes *sea*, *sec* e *tsst-1*. O gene conservado *16S rRNA* foi utilizado como referência para normalizações. A eficiência de cada par de *primers* foi calculada utilizando-se a curva padrão de diluição seriada, como descrito no protocolo da Applied Biosystems TM. A abordagem experimental foi otimizada pelo ajuste das concentrações de primers para ótimas eficiência e especificidade (Tabela 1). Reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µl, utilizando 10 µl de master mix SYBR green e 50 ng de cDNA. O ciclo térmico consistiu de: etapa inicial a 50°C/2min e a 95°C/10min, seguida de 40 ciclos de 95°C/15s e 60°C/1min. Após a amplificação, foi realizada a análise de curva de dissociação (95°C/15s, 60°C/15s e 95°C/15s) para verificação da especificidade dos amplicons gerados. As análises de qRT-PCR para todas as toxinas foram realizadas em triplicata. Níveis de expressão de amostras de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas estafilocócicas (FRI361, N315 e *Staphylococcus aureus* 36/2014) foram utilizados como dados para calibração. Os resultados são apresentados em gráficos com o nível relativo de mRNA para cada toxina obtido pelo método de quantificação derivada relativa, descrito por Hellemans *et al.* (2007).

Tabela 1. Marcadores e concentração de primers da qRT-PCR utilizados para as reações

Marcador	Sequência de <i>Primer</i> (5'-3')	<i>Primer</i>	Eficiência	Tamanho	Referência
		(µmol l <sup>-1</sup> )	(%)	do amplicon (pb)	
SEA	F: CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	1,0	90,60	127	Becker <i>et al.</i> , 1998
	R: TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C				
TSST-1	F:TTCACTATTTGTAAAAGTGTGTCAGACCCACT	1,0	91,29	180	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
	R:TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT				



SEC	F:AATAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA R:ATCAAAATCGGATTAACATTATCCATTC	0,3	90,60	80	Klotz <i>et al.</i> , 2003
16S	F:CNACGCGAAGAACCTTANC R:CGACAGCCATGCANACCT	0,3	93,25	98	Huse <i>et al.</i> , 2008

---

## 2.5. Produção *in vitro* de biofilme

Para a avaliação qualitativa de produção de biofilme, foi realizado o ensaio em Ágar Vermelho Congo (AVC) de acordo com a metodologia descrita por Arciola *et al.*, 2002. No CRA, amostras produtoras de biofilme formam colônias pretas, enquanto amostras não produtoras desenvolvem colônias vermelhas. A produção quantitativa de biofilme foi avaliada em microplacas estéreis de poliestireno inerte de fundo chato, contendo 96 poços (Dias-Souza *et al.*, 2013). Um meio sem inóculo foi utilizado como controle negativo e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 como amostra de referência. Após incubação das placas por 20 h a 37 °C foi feita a quantificação da absorbância usando um leitor de ELISA em um comprimento de onda de 620 nm. As amostras foram classificadas em quatro categorias, baseado na relação entre a densidade óptica (DO) dos poços inoculados com as amostras e os resultados obtidos para a densidade óptica do controle negativo (COD): não-formadoras, fracamente, moderadamente ou fortemente formadoras de biofilme (Amaral *et al.*, 2005). Ambos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.6. Produção *in vitro* de toxinas

A detecção da produção de enterotoxinas clássicas e da toxina do choque tóxico nas amostras foi realizada pela técnica de *Optimum Sensitive Plate* (OSP) (Robbins *et al.*, 1994). Assim, as amostras foram crescidas em 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24h. Após a incubação, placas de Petri contendo 20 mL de ágar BHI acrescentado de 1% de extrato de levedura foram revestidas com discos de membrana de diálise. Inóculo de 0,5 mL da cultura foi vertido na superfície da membrana e as placas incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, as

membranas foram lavadas duas vezes com um total de 2,5mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7,4), sendo que na primeira lavagem utilizou-se 1,5mL de tampão fosfato e na segunda, 1,0mL. As culturas, já lavadas, foram transferidas para um tubo e centrifugadas a 10000g/10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e 20µL de timerossol foram adicionados a eles. Tal sobrenadante, então, foi utilizado para a verificação da produção de TSST-1 e das demais enterotoxinas clássicas pela reação entre os anticorpos e as linhagens. Amostras controle foram utilizadas para checar a atividade dos anticorpos utilizados. Na reação positiva, o anticorpo reage com a toxina presente na amostra e se precipitam formando uma linha branca. A presença dessa linha, então, revela resultado positivo; enquanto que sua ausência revela resultado negativo.

### **2.7. Produção *in vitro* de hemolisina**

A atividade hemolítica dos SCN isolados foi avaliada por meio da semeadura dos micro-organismos em meio ágar base (*Difco*), suplementado com 5% de sangue de cavalo e posterior incubação a 37°C por 18-24h. Após esse período, zonas de hemólise foram observadas e relacionadas à capacidade de hemólise pelos micro-organismos. Uma zona translúcida foi relacionada a uma  $\beta$ -hemólise, uma zona esverdeada foi relacionada a uma  $\alpha$ -hemólise, enquanto ausência de zona de hemólise foi relacionada à  $\gamma$ -hemólise (Jundiás, 2014).

### **2.8. Teste de resistência aos antimicrobianos**

Todas as amostras foram testadas quanto à resistência a antimicrobianos pelo ensaio de difusão de disco conforme as diretrizes do CLSI (2015). Os seguintes antimicrobianos e suas respectivas concentrações foram pesquisadas: Sulfametoxazol/Trimetropin (25µg), Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Vancomicina (30µg), Eritromicina (15µg), Penicilina G (10U), Clorafenicol (30µg), Gentamicina(10µg) e Tetraciclina (30µg). As amostras foram classificadas

como sendo sensíveis, intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos testados, de acordo com CLSI (2015).

## **2.9. Análise hierárquica de clusters, teste qui-quadrado e análise de correspondência**

Uma análise hierárquica de *clusters* foi realizada no SPSS.15.0 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences - SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para identificar grupos de amostras com 14 características diferentes: fenotípicas (capacidade de fermentação de DNAse e manitol), detecção de genes de toxinas (Enterotoxinas A, C, TSST ) e de *quorum sensing* (*agr*), produção de toxinas (OSP), atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (Oxacilina, Eritromicina, Penicilina e Tetraciclina). Outras características avaliadas no estudo não foram utilizadas por apresentarem apenas um tipo de resposta. A distância euclidiana entre cada par de observações foi usada como um instrumento para medir a similaridade entre os grupos e o método de agrupamento hierárquico de Ward foi usado para agrupar amostras semelhantes (Hair Jr. *et al.* 2003; Pedroso *et al.*, 2016; 2018).

Uma análise hierárquica de *cluster* envolve três fases separadas. A primeira fase divide a amostra total em subgrupos menores. A segunda fase verifica se os grupos são significativamente diferentes e teoricamente significativos. A terceira fase gera o perfil dos *clusters*, descrevendo as características de cada considerando as 14 características avaliadas ( Jain *et al.*, 1999; Hair Jr. *et al.* 2003). A seleção do número de *clusters* foi realizada de acordo com Hair Jr. *et al.* (2003), em que o exame foi conduzido até o ponto em que as variâncias de erro foram reduzidas ao passar de um número menor para um número maior de agrupamentos. O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi aplicado para avaliar as distribuições de frequência dessas 14 características e os *clusters* em um nível de significância de 5% (Hair Jr. *et al.* 2003; Pedroso *et al.*, 2016; 2018).

A análise de correspondência foi realizada no Sistema SAS para Windows 9.2 (Sistema de Análise Estatística - SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), com nível de significância de 5%, para visualizar a relação apenas entre as seis características significativas pelo teste do qui-

quadrado, atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (eritromicina, penicilina e tetraciclina) e os *clusters*; Nesta técnica exploratória e descritiva, essas características e os *clusters* são representados espacialmente, compondo o mapa perceptivo (Hair Jr. *et al.* 2003; Pedroso *et al.*, 2016; 2018).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Caracterização fenotípica e identificação de espécie das amostras**

Todas as amostras bacterianas foram confirmadas como sendo cocos Gram positivo e catalase, coagulase e Dnase positivos, a exceção de duas amostras que apresentaram resultado negativo no teste da Dnase. Um total de 68 amostras (89,47%) foram capazes de fermentar o manitol no ágar sal manitol. A fermentação de manitol é uma importante característica de *Staphylococcus aureus*, embora algumas amostras possam ser negativas no teste devido à ocorrência de fermentação tardia do manitol (Paiva, 1991). Resultados negativos nos testes de fermentação do manitol e de Dnase foram relatados também por Kateete *et al.* (2010) ao analisarem amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*. As amostras presuntivas de *Staphylococcus aureus* tiveram a sua confirmação ao nível de espécie pela análise proteômica no MALDI- TOF MS, na qual as 76 amostras apresentaram um score  $\geq 2.000$  validando a identificação da espécie como sendo *Staphylococcus aureus*.

#### **3.2. Produção de biofilme**

A produção *in vitro* de biofilme foi analisada em CRA e em placas de poliestireno. No primeiro teste, 53 amostras (69,73%) foram caracterizadas como formadoras de biofilme. Na placa de poliestireno, as amostras foram classificadas de acordo com a relação entre a DO do controle e o DO das amostras estudadas em: não aderente (14 amostras =18,42%), fracamente

aderente (56 amostras= 73,68%) e moderadamente aderente (6 amostras=7,9%). Não houve no estudo amostras fortemente aderentes.

A produção de biofilme é um importante fator de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* associado à sua permanência no ambiente de processamento de alimentos e na persistência desses microrganismos em biomateriais, como dispositivos médicos invasivos (Becker *et al.*, 2014; Gustafson *et al.*, 2015). Embora a formação de biofilmes seja amplamente estudada sob o aspecto clínico, como em implantes e materiais médicos, poucos estudos têm sido relatados, até agora, sobre a ocorrência deste evento associado aos alimentos (Santos *et al.*, 2014; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2014; Di Ciccio *et al.*, 2015). Um biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células bacterianas protegida por uma matriz polissacarídica ou protéica, produzida pelo próprio micro-organismo, e aderente tanto a superfícies bióticas quanto abióticas (Simões *et al.*, 2010). Assim, a formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. representa uma vantagem evolutiva ao micro-organismo, tendo em vista que na forma de células sésseis, aderidas em biofilmes, as bactérias resistem melhor às condições desfavoráveis do ambiente, como tratamentos com agentes antimicrobianos e sanitizantes, dessecação e radiação ultra-violeta (Cha *et al.*, 2013).

A estruturação de um biofilme é um processo que envolve, basicamente, quatro fases principais, sendo denominadas de fase de adesão, agregação, maturação e dispersão. Estas fases envolvem eventos que são fisiologicamente diferentes entre si e requerem fatores de patogenicidade específicos (Figueiredo *et al.*, 2017). Na fase de agregação, as bactérias passam a secretar substâncias que são responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Em *Staphylococcus aureus*, a principal molécula responsável na adesão intercelular é a adesina intercelular polissacarídica (PIA) (Mack *et al.*, 1996). PIA é um polímero parcialmente desacetilado de N-acetilglicosamina, que junto com outros polímeros, tais como os ácidos teicóicos, as proteínas e o DNA extracelular (eDNA), constitui a maior parte da matriz extracelular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme (Sugimoto *et al.*, 2018). A biossíntese de PIA é realizada por genes contidos no *locus ica*, que compreendem uma transferase

N-acetilglicosamina (*icaA* e *icaD*), uma desacetilase de PIA (*icaB*), um exportador de PIA (*icaC*) e um gene regulador (*icaR*) (Heilmann *et al.*, 1996, Gerke *et al.*, 1998, Vuong *et al.*, 2004). Segundo Grinholc *et al.* (2007), todas as amostras albergando o gene *icaA*, também abrigam *icaD*. Assim, a detecção de um desses genes pode ser usado para determinar se a amostra é um produtor potencial de biofilme.

Em nosso estudo, não houve a detecção dos genes *icaA*, *icaB* e *icaC* em nenhuma das amostras. A ausência desses genes em amostras formadoras de biofilme nos testes *in vitro* sugere a participação de outros genes na formação de biofilme nas amostras de *Staphylococcus aureus* do nosso estudo. A literatura descreve a formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus* spp. por mecanismos independentes de PIA (Foster *et al.*, 2014). Um destes mecanismos envolve a ação uma proteína de superfície ligada à parede celular de *Staphylococcus aureus* chamada de Bap (proteína associada a biofilme). Bap foi inicialmente descrito em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite, e há evidências do papel de Bap durante a infecção de glândulas mamárias bovinas (Valle *et al.*, 2012; Speziale *et al.*, 2014). Mutagênese por transposon seguida de identificação do gene inativado mostrou que a proteína Bap está envolvida na formação de biofilme amostra de *S. aureus* V329 de mastite bovina (Cucarella *et al.*, 2001). A proteína de superfície C de *Staphylococcus aureus* (SasC) representa outro fator proteico envolvido na agregação celular e na formação de biofilme. A expressão de SasC media a formação de agregados bacterianos, a maior adesão ao poliestireno e o aumento de formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* (Schroeder *et al.*, 2009).

### **3.3. Detecção dos genes codificadores de toxinas estafilocócicas**

Nós também avaliamos as amostras de *S. aureus* quanto à detecção da presença dos genes codificadores de toxinas por PCR e 26 amostras (34,21%) carregaram no mínimo um dos genes pesquisados. Nós observamos que os genes de maior ocorrência foram *sea* e *tsst-1* (14 amostras=18,42%), seguido por *sec* (duas amostras=2,63%) Uma amostra isolada de queijo

apresentou os genes *sea*, *sec* e *tsst-1* concomitantemente e outras duas amostras, uma isolada de queijo e outra de leite cru, apresentaram tanto *sea* quanto *tsst-1*. Os genes *seb*, *sed* e *see* não foram detectados em nenhuma das amostras do estudo.

SEA tem sido descrita na literatura como a principal enterotoxina envolvida em casos de intoxicação alimentar (Hennekinne *et al.*, 2012; Clarisse *et al.*, 2013), seguida por SED, SEB e SEC (Hu e Nakane, 2014). Por outro lado, SEE parece não ter uma grande importância nos casos de intoxicação alimentar descritos no mundo (Carmo *et al.*, 2002; Asao *et al.*, 2003; Sophia *et al.*, 2015). Na França, por exemplo, o primeiro relato de surto de intoxicação alimentar causada pela SEE foi descrito apenas no final de 2009 envolvendo um queijo fresco elaborado com leite cru (Ostyn *et al.*, 2010).

Do total de amostras portadoras do gene *sea*, sete amostras (50%) foram obtidas a partir do QMA, quatro amostras (28,57%) do leite cru e três amostras (21,43%) do soro-fermento. Em relação às amostras portadoras do gene *sec*, uma amostra foi isolada de QMA e outra de leite cru. Já em relação às amostras portadoras do gene *tsst-1*, seis amostras (42,86%) foram obtidas de QMA, duas amostras (14,29%) de leite cru, uma amostra (7,14%) de soro-fermento e cinco amostras (35,71%) de manipuladores. A alta ocorrência de *tsst-1* em amostras obtidas de manipuladores é preocupante, tendo em visto que *S. aureus* pode se abrigar na pele, trato gastrointestinal e narinas desses manipuladores e esses sítios se tornarem possíveis reservatórios de distribuição de *S. aureus* patogênicos (Verhoeven *et al.*, 2014). Estimativas da prevalência de amostras que codificam *tsst-1* em portadores saudáveis variam de 13 a 25%, indicando um grande potencial de doença, embora a incidência de casos seja relativamente baixa (1-4 / 100.000) (Gaventa *et al.*, 1989; Parsonnet *et al.*, 2005; Megevand *et al.*, 2010; Lamy *et al.*, 2012).

### **3.4. Expressão dos genes codificadores de toxinas estafilocócicas**

A Figura 1 mostra que do total de 30 genes detectados pelo ensaio de PCR, 25 genes tiveram sua expressão relativa confirmada. Nós observamos a ausência de expressão em quatro

genes *sea*, presentes em *S. aureus* obtidos de três amostras de queijo e de uma amostra de leite cru, e em um gene *tsst-1* presente em *S. aureus* isolado de leite cru.

A expressão dos genes das toxinas de cada amostra de *Staphylococcus aureus* foi comparada com a expressão dos genes das toxinas de amostras controle positivo para o cálculo da quantificação relativa, considerando que a taxa de expressão relativa normalizada para cada gene de toxina é igual a 1. Nós podemos observar na figura 1, que apenas um gene *tsst-1* pertencente à *S. aureus* isolado de manipulador (amostra 53) apresentou expressão superior à da amostra controle, indicando um alto potencial toxigênico dessa amostra. Os demais genes analisados no estudo foram de baixa expressão nas condições de crescimento analisadas, sendo que o menor nível de expressão no estudo (aproximadamente  $10^5$  vezes inferior ao nível de expressão do gene da amostra controle positivo) foi detectado no gene *sea* de *S. aureus* isolado de queijo (amostra 41).

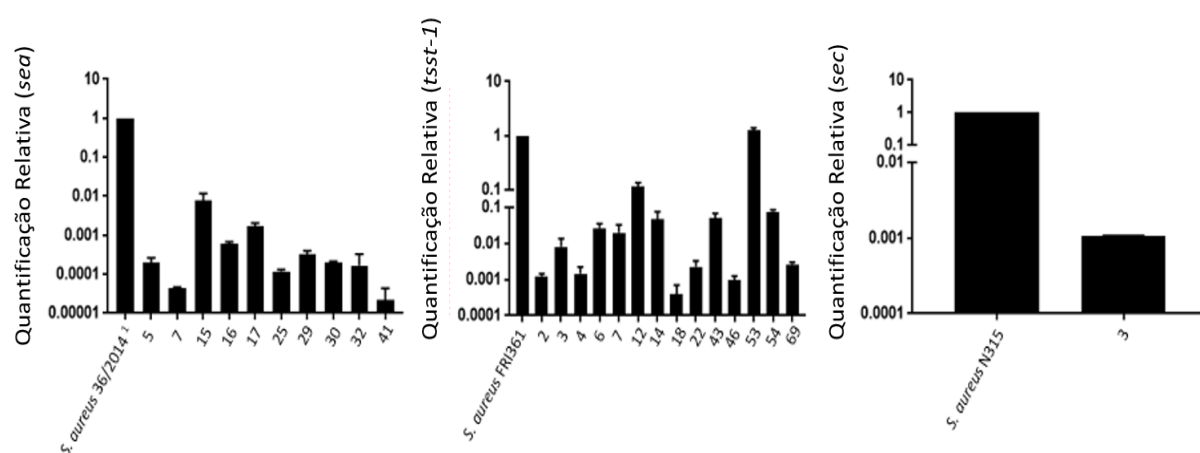


Figura 1. Nível de expressão de *sea*, *tsst-1* e *sec* por amostras de *Staphylococcus aureus*  
1 Amostra utilizada como controle positivo para *sea* gentilmente cedida pela Fundação Ezequiel Dias - Belo Horizonte, Minas Gerais

A baixa expressão de genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* e a ausência de expressão foram descritas em demais estudos na literatura (Derzelle *et al.*, 2009; Márta *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2015). Sabe-se que a expressão dos genes das toxinas de *Staphylococcus* spp. está fortemente associada às condições de crescimento do micro-organismo no meio, como temperatura, pH, taxa de oxigênio, fase de crescimento microbiano e concentração de glicose



(Regassa *et al.*, 1991; Derzelle *et al.*, 2009; Tsutsuura *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado na literatura que a transcrição do *sea* está ligada ao estresse bacteriano, ao ciclo de vida dos Siphoviridae, família de bacteriófagos que abrigam a região de patogenicidade que codifica a SEA, e que a natureza polimórfica do prófago afeta a expressão de *sea* e a quantidade de SEA produzida pela amostra bacteriana portadora do prófago (Borst e Betley 1994, Sumbly *et al.* 2003, Cao *et al.*, 2012, Zeaki *et al.*, 2015). Assim, amostras portadoras do alelo *sea1* apresentam alta expressão de *sea*, enquanto as portadoras do alelo *sea2* apresentam baixa expressão de *sea* (Cao *et al.*, 2012).

Por outro lado, a expressão dos genes de outras toxinas estafilocócicas como SEB, SEC, SED e TSST está condicionada à ação de sistemas de transdução de sinal de dois componentes e à reguladores de transcrição que modulam a expressão de fatores de patogenicidade em *S. aureus*, como os sistemas Agr, *saeRS*, sigB, SarA e ROT (Cretenet *et al.*, 2011; Andrey *et al.*, 2015). Assim, a baixa expressão desses reguladores, influenciada por uma série de fatores ambientais e por interações genéticas, é associada à perda substancial no nível de transcrição de *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1* e, portanto, à baixa produção destas toxinas (Queck *et al.*, 2008; Even *et al.*, 2009; Thoendel *et al.*, 2011; Rudkin *et al.*, 2012).

Importante ressaltar que a ausência ou a baixa expressão dos genes das EE nas amostras do estudo não exclui a possibilidade de essas amostras produzirem uma grande quantidade de toxina no alimento. Estudos têm demonstrado que em sistemas planctônicos, como os meios de cultivo em caldos utilizados no nosso trabalho, os micro-organismos podem apresentar um perfil de expressão dos seus genes diferente do que apresentam em ambientes multicelulares, como o alimento, onde as bactérias parecem se associar de maneiras distintas e há uma prevalência de interação celular por meio de sinalização molecular (Even *et al.*, 2009; Wallin-Carlquist *et al.*, 2010, Cretenet *et al.*, 2011; Valihrach *et al.*, 2014). A respeito disso, Cretenet *et al.* (2011), utilizando uma abordagem transcriptômica para estudar a expressão de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* em uma matriz de queijo sob a influência de *Lactococcus lactis*, mostraram que a expressão do SEA foi levemente aumentada na matriz de queijo se comparada

a expressão observada no *Chemically Defined Medium (CDM)*, devido a presença de ambiente ácido e de maior estresse oxidativo capaz de ativar o prófago codificador de *sea*.

### **3.5. Produção *in vitro* de toxinas estafilocólicas**

Nós também investigamos a produção das toxinas pelas amostras do estudo por meio da técnica de OSP. Neste ensaio, apenas duas amostras de *Staphylococcus aureus*, uma de manipulador e outra de soro-fermento, foram produtoras de TSST. A baixa frequência e até mesmo a ausência de ocorrência de amostras produtoras de toxina *in vitro* são relatadas em diversos estudos, inclusive de amostras isoladas de surtos e infecções clínicas (Cunha *et al.*, 2007; Pedroso *et al.*, 2016). Os autores atribuem à condição de crescimento experimental do agente microbiano e à baixa eficiência das técnicas de quantificação de toxinas estafilocólicas em detectar amostras bacterianas de baixa produção como justificativa para os resultados encontrados. De fato, esta presunção parece se consolidar no nosso trabalho, tendo em vista que as duas amostras produtoras de TSST *in vitro* (12 e 53) foram àquelas que apresentaram maiores níveis de expressão de *tsst-1* na qRT-PCR.

### **3.6. Produção *in vitro* de hemolisina**

Nós observamos 14 amostras (18,42%) de *Staphylococcus aureus* produtoras de  $\alpha$  hemolisina, 29 (38,16%) de  $\beta$  hemolisina e 33 (43,42%) que não apresentaram padrão de hemólise ( $\gamma$  hemólise). Resultados semelhantes, com maior proporção de  $\gamma$  hemólise e menor proporção de  $\alpha$  hemólise foram descritos por Ariyanti *et al.* (2011) ao analisarem a atividade hemolítica de *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes produtos de origem animal.

As hemolisinas são toxinas que auxiliam na invasão celular, na evasão à resposta imune do hospedeiro e estão associadas às alterações patológicas observadas durante o curso de infecções estafilocólicas (Otto, 2015). No nosso estudo, a maioria (61,84%) das amostras de

*Staphylococcus aureus* foram produtoras de hemolisinas (alfa ou beta), o que revela o potencial patogênico das amostras. A alta taxa de amostras com  $\gamma$  hemólise condiz com o fato de que os glóbulos vermelhos de cavalo sejam intensamente afetados pela leucocidina, uma das proteínas integrantes do sistema de dois componentes da toxina gama (Dinges *et al.*, 2000).

### **3.7. Detecção do gene *agr* (Sistema de *quorum sensing*)**

Nós observamos a presença de *agr* em 59 (77,63%) amostras de *Staphylococcus aureus*. O sistema Agr é o principal sistema de regulação de dois componentes envolvido na modulação da expressão de fatores de patogenicidade em *Staphylococcus* spp. De forma geral, ele atua estimulando a produção de proteínas extracelulares, como a alfa-toxina, beta-hemolisina, TSST-1 e algumas enterotoxinas estafilocócicas, e inibindo as proteínas associadas à parede celular, como as responsáveis pela formação de biofilme, em resposta a concentrações crescentes da molécula sinalizadora, o peptídeo auto-indutor (AIP), codificada pelo gene *agr* (Queck *et al.*, 2008).

A ausência de *agr* em algumas amostras de *Staphylococcus aureus* (22,37%), em especial naquelas que expressaram o gene *tsst* e *sea* na qRT-PCR e que foram produtoras de TSST no ensaio *in vitro*, sugerem a atuação de outros sistemas de *quorum sensing* na modulação da expressão dos fatores de patogenicidade nesses micro-organismos, como SarA, sigma  $\beta$  e ROT. De fato, a expressão de *sea* tem sido descrita na literatura como independente de *agr* e mutações em alguns reguladores negativos de *tsst*, como *sigB*, *sarA* e, provavelmente, *rot*, para além de estímulos ambientais (taxa de crescimento, pH e oxigênio), podem aumentar profundamente a expressão de TSST-1 (Andrey *et al* 2015). Da mesma forma, estudos têm mostrado a participação de vias independentes de *agr* na modulação da formação de biofilmes. Corroborando este fato, em trabalho realizado por Benkeen *et al.* (2010), uma mutação de *sarA*, que codifica a proteína SarA, resultou em uma menor capacidade de formação de biofilme em todas as amostras clínicas analisadas, independentemente do estado funcional de *agr* nas amostras.

### 3.8. Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras

Nós não observamos a presença do gene *mecA* nas amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas, assim como relatado por Martins *et al.* (2015), embora uma amostra isolada de queijo tenha apresentado resistência intermediária à oxacilina no teste de difusão de disco. Tal observação pode ser devida ao fato de que embora *mecA* seja o principal gene associado a amostras resistentes à meticilina, outros genes cromossômicos podem influenciar na expressão dessa resistência, como os fatores essenciais para a resistência à meticilina (*fem*), fatores auxiliares (*aux*) e alta resistência à meticilina (*hmt*) (Peacock e Paterson 2015). Além disso, alguns recentes trabalhos associam o gene *mecC*, um homólogo de *mecA*, ao fenótipo de resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* (Paterson *et al.*, 2014; Porrero *et al.*, 2014). Assim, não é incomum o relato de amostras resistentes à oxacilina; porém, sem apresentarem o gene *mecA* (Mendonça *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2014).

Todas as amostras do estudo foram sensíveis aos antimicrobianos Sulfametoxazol/Trimetropin, Cefoxitina, Gentamicina, Vancomicina e Clorafenicol no teste de difusão de disco. Por outro lado, nós observamos resistência de quatro amostras (5,26%) à eritromicina, 21 amostras (27,63%) à tetraciclina e 51 (67,11%) amostras à penicilina. Entretanto, nenhuma amostra apresentou multirresistência (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes) aos fármacos avaliados. A baixa ocorrência de amostras resistentes a eritromicina também foi relatada por Jamali *et al.* (2015) ao estudarem o perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolado de leite e derivados em uma província no Iran. As maiores porcentagens de amostras de *S. aureus* resistentes à tetraciclina e à penicilina no nosso estudo eram esperadas, devido ao fato de estes antimicrobianos serem usados de forma generalizada e indiscriminada no controle e tratamento das principais infecções em explorações leiteiras (Jamali *et al.*, 2013).

### 3.9. Análise hierárquica de *cluster*

As 76 amostras foram agrupadas em seis grupos de acordo com características fenotípicas (DNAse e capacidade de fermentação de manitol), produção de toxinas (Enterotoxinas A, C, TSST e OSP), atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (Oxacilina, Eritromicina, Penicilina e Tetraciclina) (Tabela 2). As distribuições de frequência dos *clusters* diferiram quanto à atividade hemolítica ( $\chi^2 = 22,57$ ;  $P = 0,012$ ), formação de biofilme qualitativa ( $\chi^2 = 11,66$ ;  $P = 0,040$ ) e quantitativa ( $\chi^2 = 65,72$ ;  $P < 0,001$ ), e resistência à eritromicina ( $\chi^2 = 86,29$ ;  $P < 0,001$ ), à penicilina ( $\chi^2 = 76,00$ ;  $P < 0,001$ ) e à tetraciclina ( $\chi^2 = 72,00$ ;  $P < 0,001$ ). No entanto, as distribuições de frequência de *clusters* não diferiram para DNAse ( $\chi^2 = 9,48$ ;  $P = 0,09$ ), capacidade de fermentação de manitol ( $\chi^2 = 3,20$ ;  $P = 0,67$ ), produção de enterotoxinas A ( $\chi^2 = 1,07$ ;  $P = 0,96$ ), C ( $\chi^2 = 1,58$ ;  $P = 0,90$ ), TSST ( $\chi^2 = 5,64$ ;  $P = 0,34$ ) e OSP ( $\chi^2 = 5,38$ ;  $P = 0,37$ ), detecção de *agr* ( $\chi^2 = 3,97$ ;  $P = 0,55$ ) e resistência à oxacilina ( $\chi^2 = 2,65$ ,  $P = 0,75$ ).

Tabela 2. Perfil de clusters baseado em características fenotípicas (capacidade de fermentação de DNAse e manitol), produção de toxinas (Enterotoxinas A, C, TSST e OSP), atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (Oxacilina, Eritromicina, Penicilina e Tetraciclina)

Cluster	N	Níveis (%) <sup>a</sup>	Fenótipo		Enterotoxina				Genótipo	Atividade hemolítica	Formação de biofilme		Resistência Microbiana			
			Dnase	Fermentação do Manitol	A	C	TSST	OSP	AGR		Qualitativa	Quantitativa	Oxacilina	Eritromicina	Penicilina	Tetraciclina
1	5	0	0	0	80	100	60	100	0	80	40	0	100	100	0	80
		1	100	100	20	0	40	0	100	20	60	60	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	20
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0
2	22	0	5	9	82	95	73	100	18	27	14	9	100	82	100	100
		1	95	91	18	5	27	0	82	36	86	91	0	18	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	20	0	0	10	80	100	80	100	30	15	35	25	100	100	0	0
		1	100	90	20	0	20	0	70	40	65	75	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	0	0	100	100
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	21	0	0	19	81	95	90	90	29	0	52	33	95	100	0	100
		1	100	81	19	5	10	10	71	38	48	67	5	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	62	0	0	0	0	100	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	4	0	25	0	100	100	100	100	0	0	0	0	100	75	100	100
		1	75	100	0	0	0	0	100	75	100	0	0	25	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
6	4	0	0	0	75	100	100	100	25	25	0	0	100	0	0	100
		1	100	100	25	0	0	0	75	25	100	100	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	100	100	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Teste X<sup>2</sup></b>			9,477	3,202	1,066	1,578	5,642	5,380	3,967	<b>22,567</b>	<b>11,658</b>	<b>65,721</b>	2,654	<b>86,291</b>	<b>76,000</b>	<b>71,999</b>
<b>Valor de p<sup>b</sup></b>			0,091	0,669	0,957	0,904	0,343	0,371	0,554	<b>0,012</b>	<b>0,040</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,753	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

<sup>a</sup> Nível 0 é negativo e 1 é positivo para DNase, fermentação de manitol, produção de enterotoxinas, detecção de *agr* e formação qualitativa de biofilme; O nível 0 é  $\alpha$ , 1 é  $\beta$  e 2 é  $\gamma$  para atividade hemolítica; O nível 0 é não aderente, 1 é fracamente aderente, 2 é moderadamente aderente e 3 é fortemente aderente para formação quantitativa de biofilme; O nível 0 é sensível, 1 é intermediário e 2 é resistente à resistência microbiana; <sup>b</sup> Números em negrito foram significativos pelo teste do qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

A análise de correspondência foi utilizada para visualizar a relação entre estes *clusters* formados com a atividade hemolítica, a formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e a resistência microbiana (eritromicina, penicilina e tetraciclina) por meio do mapa perceptivo resultante (Figura 2). As duas primeiras dimensões deste mapa explicaram 64,7% da variabilidade dos dados experimentais.

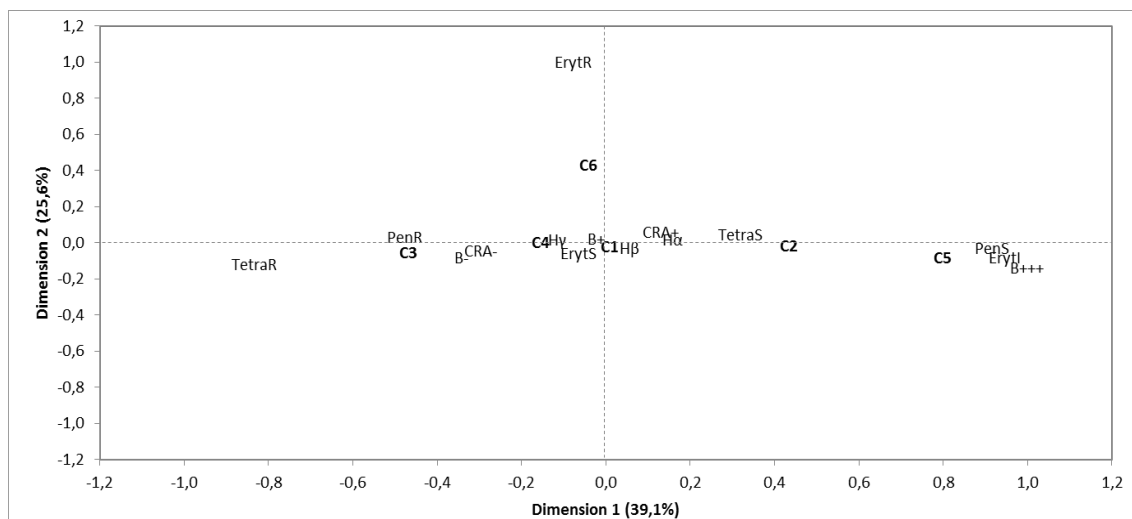


Figura 2. Mapa perceptivo da análise de correspondência entre atividade hemolítica, formação de biofilme (qualitativa e quantitativa) e resistência microbiana (eritromicina, penicilina e tetraciclina) e os *clusters*.

**Legenda:** C1: *Cluster* 1; C2: *Cluster* 2; C3: *Cluster* 3; C4: *Cluster* 4; C5: *Cluster* 5; C6: *Cluster* 6; H $\alpha$ : atividade hemolítica  $\alpha$ ; H $\beta$ : Atividade hemolítica  $\beta$ ; H $\gamma$ : Atividade hemolítica  $\gamma$ ; CRA-: amostras não produtoras de biofilme; CRA+: amostras produtoras de biofilme; B-: biofilme não aderente; B+: biofilme fracamente aderente; B+++: biofilme fortemente aderente; ErytS: sensível à eritromicina; ErytI: intermediário à eritromicina; ErytR: resistente à eritromicina; PenS: sensível à penicilina; PenR: resistente à penicilina; TetraS: sensível à tetraciclina; TetraR: resistente a tetraciclina.

O perfil de cada *cluster* pode ser descrito e discriminado pelas suas principais características (Tabela 2 e Figura 2). O *cluster* 1 mostrou uma quantidade considerável (40%) de amostras não produtoras de biofilme com produção de enterotoxina TSST e de biofilme fortemente aderente, e a maioria das amostras com atividade hemolítica  $\alpha$ . Este grupo era resistente apenas à penicilina. O *cluster* 2 foi formado por amostras sensíveis a todos os antimicrobianos avaliados nesta análise. O *cluster* 3 foi composto por amostras resistentes à penicilina e foi o único grupo de amostras resistentes à tetraciclina. Eles também mostraram uma quantidade considerável (40%) de amostras não produtoras de biofilme como o *cluster* 1. O

*cluster* 4 foi o único a mostrar uma quantidade considerável de amostras não produtoras de biofilme (52%) com produção de biofilme não aderente (33 %) e atividade hemolítica  $\gamma$  (48%). Eles também eram resistentes apenas à penicilina como o *cluster* 1. O *cluster* 5 foi o único a mostrar uma produção de biofilme fortemente aderente e a maioria das amostras com atividade hemolítica  $\beta$ . Eles foram formados por amostras sensíveis a todos os antimicrobianos como o *cluster* 2. O *cluster* 6, por fim, foi resistente à penicilina e o único grupo de amostras resistentes à Eritromicina.

#### 4. CONCLUSÕES

As amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de QMA, leite cru, soro fermento e manipuladores de Campo das Vertentes- Brazil apresentaram potencial toxigênico, com maior prevalência de *sea* e *tsst-1*, embora tenham sido genes de baixa expressão. Entretanto, o biofilme foi o principal fator de patogenicidade encontrado, pois mais da metade das amostras foram formadoras de biofilme nos ensaios realizados. Por outro lado, nenhuma amostra portou o gene *mecA* nem apresentou padrão de multirresistência aos antimicrobianos de uso comum nas medicinas veterinária e humana testados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREY, D. O.; JOUSSELIN, A.; VILLANUEVA, M. *et al.* Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the Toxic Shock Tst Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10(8): e0135579, 2015.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S. *et al.* Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials* 23:4233e4239, 2002.



BARAN, A.; ERDOGAN, A.; TURGUT, T. *et al.* A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. *Tr. Doğa ve Fen Derg.-Tr. J. Nature Sci.* 6: 100-105, 2017.

BASSET, P.; PROD'HOM, G.; SENN, L. *et al.* Very low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J. Hosp. Infect.* 83:257-259, 2013.

BORST, D. W. E BETLEY, M. J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infect. Immun.* 62:113-118, 1994.

BREVES, A.; MIRANDA, C. A.; FLORES, C. *et al.* Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. *J. Bras. Patol. Med.* 51:143-152, 2015.

BURNSIDE, K.; LEMBO, A.; REYES, M. *et al.* Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase. *PLoS ONE* 5(6): e11071, 2010.

CHA, J. O.; YOO, J. I.; YOO, J. S. *et al.* Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res. Perspect.* 4:225-232, 2013.

CLARISSE, T.; MICHELE, S.; OLIVIER, T. *et al.* Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. *Food Control* 32: 255-261, 2013.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N F. *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67:5427-33, 1999.

CRETENET, M.; NOUAILLE, S.; THOUIN, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* 3:340-351, 2011.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J. *et al.* Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183:2888-2896, 2001.

CUNHA, M. D. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O. E JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol. Immunol.* 51:381-390, 2007.

DERZELLE S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M. *et al.* Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.* 26:896-904, 2009.

DIAS-SOUZA, M-V.; ANDRADE, S.; AGUIAR, A. P. Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract, *J. Nat. Prod.* 6:198e205, 2013.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M. E SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16-34, 2000.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A.; BELTRAME, C. O. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit. Rev. Microbiol.* 43:602-620, 2017.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 49–62, 2014.

GAVENTA, S., REINGOLD, A. L.; HIGHTOWER, A. W. *et al.* Active surveillance for toxic shock syndrome in the United States, 1986. *Rev. Infect. Dis.* 11:S28-34.Epub, 1989.

GENIGEORGIS, C., FODA, M. S.; MANTIS, A. *et al.* Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* 21:862-866. 1971.

GRINHOLC, M; WEGRZYN, G. e KURLEND, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the icaD gene in methicillin-resistant and methicillinsusceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50:375-379,2007.

HAIR, J. F.; WOLFINBARGER M.; MONEY A. H.; *et al.* Essential of business research methods. John Wiley & Sons, 2003.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER M. L.; DRAGACCI S.. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:815-836. 2012.

JAIN, A. K., MURTY M.N.; FLYNN P.J. Data clustering: a review. *ACM Comput. Surv.*31: 264-323. 1999.

JAMALI, H., AND RADMEHR B. Frequency, virulence genes and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. isolated from bovine clinical mastitis. *vet. j.* 198: 541-542.

JOHLER, S.; MACORI G.; BELLIO A.; *et al.* Short communication: characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *J. Dairy sci.* 101: 2915- 2920. 2018.

BECKER K.; HEILMANN C.; PETERS G.. Coagulase-negative *staphylococci*, *clin. Microbiol. Rev.* 27:870e926. 2014.

KATEETE, D. P., KIMANI C. N.; KATABAZI F. A.; *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus*: dnase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9: 23. 2010.

KLOSS, W. E. Systematics and the natural history of *staphylococci*. *J. Appl. Bacteriol.* Supplement 69:25S-37S. 1990.

KONG, C.; NEOH H.; NATHAN S.. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins.* 8:72. 2016.

KREISWIRTH, B. N.; PROJAN S. J; SCHLIEVERT P. M. *et al.* Toxic shock syndrome toxin 1 is encoded by a variable genetic element. *Rev. Infect Dis.* 11:S83–8. 1989.

LAMY, B.; LAURENT F.; GALLON O. *et al.* Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among *Staphylococcus aureus* isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:1279-84. 2012.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; Pimentel-Filho, N. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Braz. J. Microbiol.* vol. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

MEGEVAND, C.; GERVAIX, A.; HEININGER, U. *et al.* Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1414-20, 2010.

MELO, D. A.; COELHO, I. S.; MOTTA, C. C. *et al.* Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. *Braz J Microbiol.* 2014; 45:1075-1082, 2014.

MELO, T. A.; SANTOS, T. F.; ALMEIDA, M. E. *et al.* Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol.* 16:250, 2016.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A. *et al.* Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 32:859-864, 2012.

ONO, H.K.; SATO'O, Y.; NARITA, K. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7034-7040, 2015.

OTERO, A., GARCIA, M. L.; GARCIA, M. C. *et al.* Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:555-559, 1990.

OTTO M. 2015. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17: 32–37.

PAIVA, R. G. 1991. Aprova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. *Rev. Pat. Trop.* 20:21-33.

PARSONNET J.; HANSMANN, M. A.; DELANEY, M. L. *et al.* Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *J. Clin. Microbiol.* 43:4628-34, 2005.

PATERSON G. K., HARRISON, E. M. E HOLMES. M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trend. Microb.* 22 (1): 42-47, 2014.

PEACOCK, S. J.; E PATERSON, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ann. Rev. Biochem.* 84: 577-601, 2015.

PERIASAMY, S.; JOO, H. S.; DUONG. A. C. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:1281-1286, 2012.

PORRERO, M. C.; HARRISON, E. M.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. *et al.* Detection of mecC-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. *Environ. Microb. Rep.* 6 (6): 705 – 708, 2014.

QUECK, S. Y.; JAMESON-LEE, M.; VILLARUZ, A. E. *et al.* RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* 32:150-158, 2008.

REGASSA, L. B.; COUCH, J. L. E BETLEY, M. J. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (agr) and by glucose. *Infect. Immun.* 59:955-962, 1991.

REINOSO, E.; BETTERA, S.; FRIGERIO, C. *et al.* RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human. *Hosts. Microbiol. Res.* 159:245e255, 2004.

REISER, R.; ROBBINS, R.; NOLETO, A. *et al.* Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect. Immun.* 45:625-630, 1984.

RUDKIN, J. K., EDWARDS, A. M.; BOWDEN, M. G. *et al.* Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J. Infect. Dis.* 205:798-806, 2012.

SCHROEDER, K.; JULARIC, M.; HORSBURGH, S. M. *et al.* Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS ONE* 4:e7567, 2009.

SHITTU, A; LIN, J.; E MORRISON, D. Molecular identification and characterization of mannitol-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.* 57:93-95, 2007.

SUGIMOTO, S.; SATO, F.; MIYAKAWA, R. *et al.* Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8:2254., 2018.

SUMBY, P.; E WALDO. M. K. Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J. Bacteriol.* 185:6841–6851, 2003.

SURIYAPHOL, G.; SARIKAPUTI, M., E SURİYAPHOL, P. Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32:491-502, 2009.

THOENDEL M.; KAVANAUGH, J. S.; FLACK, C. E. *et al.* Peptide signaling in the staphylococci. *Chem. Rev.* 111:117–151, 2011.

TSUTSUURA, S., SHIMAMURA, Y. e MURATA, M. Temperature dependence of the production of staphylococcal enterotoxin A by *Staphylococcus aureus*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 77: 30-37, 2013.

ZEAKI, N.; SUSILO, Y. B.; PREGIEL, A. *et al.* Prophage-encoded staphylococcal enterotoxin A: regulation of production in *Staphylococcus aureus* strains representing different sea regions. *Toxins* 7: 5359-5376, 2015.

## **Capítulo 3**

**Diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil**

## 1. Introdução

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais encontrados em queijos elaborados com leite cru no mundo, incluindo o queijo Minas artesanal, um dos queijos mais populares e consumidos no Brasil (Carmo *et al.*, 2002; EFSA, 2010; Sophia *et al.*, 2015). A presença de *Staphylococcus aureus* no produto final é associada principalmente ao uso de leite cru obtido de animais com mastite no rebanho, mas também ao uso de soro-fermento, popularmente conhecido como “pingo”, contaminado com o micro-organismo e à presença de manipuladores portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* (Martins *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016; Johler *et al.*, 2018). Estima-se que cerca de 30 a 50% da população abriga *Staphylococcus aureus* na pele, na orofaringe e nas narinas e esses sítios podem se tornar possíveis reservatórios de distribuição de *S aureus* patogênicos no ambiente (Verhoeven *et al.*, 2014).

Há uma grande preocupação associada à presença de *Staphylococcus aureus* no alimento, tendo em vista que algumas linhagens em condições ideais de crescimento produzem enterotoxinas termoestáveis, responsáveis pelo quadro de intoxicação alimentar no homem (Ono *et al.*, 2015). Além das enterotoxinas, *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir uma série de fatores de patogenicidade que levam ao desenvolvimento de diferentes doenças no homem e no animal, como a endocardite, a pneumonia e a síndrome do choque tóxico (Brown *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2015).

A tipificação epidemiológica de isolados bacterianos é útil na elucidação das fontes envolvidas na disseminação de surtos alimentares e de infecções, além de auxiliar na determinação da extensão destes eventos e na elaboração de medidas de controle (Maccannell, 2013). Ao longo dos anos, muitos métodos de tipificação baseados em uma abordagem genômica foram desenvolvidos para *Staphylococcus aureus*. Embora a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) seja reconhecida como o padrão ouro, sobretudo nos estudos de microepidemiologia, abordagens baseadas em sequências de DNA têm se tornando mais frequentes, por gerarem uma tipificação inequívoca cujas sequências obtidas podem ser comparadas entre laboratórios e ao longo do tempo (Ross *et al.*, 2005; O’Hara *et al.*, 2016). Nesse



sentido, destacam-se a tipagem de sequência multilocus (MLST), que é um método baseado no polimorfismo de sequência de fragmentos de sete genes conservados de *Staphylococcus aureus*, e a tipagem da proteína A, a qual avalia as repetições presentes apenas na região X do gene *spa* (Chambers e Deleo 2009).

O método de tipificação da proteína A, baseado no sequenciamento de DNA de um único *locus*, é de mais fácil execução e menos dispendioso que o MLST (O'Hara *et al.*, 2016). A região X é constituída por um número variável de repetições de 24 pb flanqueadas por regiões bem conservadas e sua diversidade advém da ocorrência de duplicação, inserção, deleção das unidades repetitivas, como também de substituição e mutações pontuais destas, sendo demonstrado que estas excedem em muito os eventos de recombinação em *S. aureus*. Esse método de tipificação baseado em sequência de *locus* único combina várias vantagens técnicas, como rapidez, reprodutibilidade e portabilidade. Além disso, devido à sua estrutura repetitiva, o *locus spa* indexa simultaneamente micro e macrovariações, permitindo o uso de tipagem de *spa* em estudos epidemiológicos locais e globais, sendo comumente utilizado em investigações evolutivas clonais de *Staphylococcus aureus* (Koreen *et al.*, 2004; Hallin *et al.*, 2007; Strommenger *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado uma boa correlação entre os agrupamentos clonais determinados pelo MLST e os respectivos tipos de *spa* e em alguns casos até mesmo um maior poder discriminatório de *spa* em relação ao MLST (Rodriguez *et al.*, 2015; O'Hara *et al.*, 2016). Além disso, a subtipagem de amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) provou ser quase tão discriminatória quanto a PFGE (Shopsin *et al.*, 1999; Koreen *et al.*, 2004; Deurenberg *et al.*, 2007).

A tipificação de *Staphylococcus aureus* pelo método de reação em cadeia da polimerase baseada em sequência repetitivas de elementos (rep-PCR) representa uma técnica de fácil execução em contraposição à métodos que exigem equipamento especializado inatingível para laboratórios clínicos de rotina. Esse método utiliza *primers* direcionados a sequências repetitivas intercaladas no genoma das bactérias (Švec *et al.*, 2010). Nesse sentido, o método  $(GTG)_5$  tem sido descrito na investigação da diversidade de *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes

fontes e é considerado comparável com os descritos acima para diferentes espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus* (Manga e Vyletělová 2012; Rodriguez *et al.*, 2015).

Uma alternativa aos métodos de tipificação baseados em sequências genômicas é a tipificação de isolados bacterianos por uma abordagem proteômica, a partir da análise do perfil de proteínas de uma célula bacteriana (Singhal *et al.*, 2015). A técnica denominada *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF MS) associada à espectrometria de massa foi recentemente destacada como um método de tipificação poderoso apropriado para estudos de epidemiologia local e global, suficientemente reprodutível e sensível para examinar de forma rápida a evolução dos fenótipos bacterianos existentes ou emergentes (Berrazeg *et al.* 2013; Mencacci *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). Além disso, embora o custo da instrumentação do MALDI-TOF MS seja comparável ao de uma máquina de sequenciamento, os custos de operação e de materiais de consumo são consideravelmente menores se comparados aos métodos genômicos de sequenciamento (Barbuddhe *et al.*, 2008).

Assim, o objetivo do nosso trabalho foi investigar a diversidade de *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes fontes de queijarias artesanais na região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, Brasil, por meio de diferentes métodos de tipificação. A comparação do perfil entre *S. aureus* de diferentes origens (leite cru, manipuladores, soro-fermento (pingo), queijo Minas artesanal, propriedades) é útil na compreensão do papel destas fontes como reservatório de linhagens patogênicas e dos aspectos epidemiológicos envolvidos na disseminação desse patógeno. Além disso, objetivamos comparar a concordância, o poder discriminatório e a tipabilidade entre os métodos de tipificação aplicados no estudo.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir de cultura recém-cultivada em caldo BHI por meio da metodologia adaptada descrita por Fan *et al.* (1995), com substituição do tampão fosfato-salino (PBS pH 7,2) por tampão tris-EDTA (TE pH 8.0) e 1mL de cultura centrifugada a 14.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado com 200 µL de TE (pH 8.0), homogeneizado e centrifugado por 13000 g por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O pellet obtido foi ressuscitado em 50 µL de TE (pH 8.0). A suspensão de células foi então submetida à fervura direta a 95°C por 15 minutos e, em seguida, congelada totalmente por aproximadamente 30 minutos. Por fim, foi homogeneizada, centrifugada a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA liberado foi estocado a -20°C. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo.

## **2.2. Identificação molecular das amostras**

A identificação de *Staphylococcus aureus* previamente realizada por testes fenotípicos foi confirmada por meio de PCR do gene *nuc* e *16S rRNA*, seguindo os *primers* e as condições de amplificação descritos por Sasaki *et al* (2010) e Monday e Bohach (1999), respectivamente.

## **2.3. Tipificação pelo método de amplificação e sequenciamento de *spa***

Para a amplificação e sequenciamento da região polimórfica X do gene *spa*, nós seguimos o protocolo de Harmsen *et al.* (2003). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o termociclador ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o programa *spa typing plugin* da *BioNumerics 7 software* ((Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) por meio do banco de dados *SeqNet/Ridom Spa Server* (<http://www.spaserver.ridom.de/>) foi usado para a análise das sequências e atribuições dos tipos de *spa*. A construção do dendrograma e do *minimum spanning trees* (MST) também foi realizada pelo programa *spa typing plugin* da *BioNumerics 7 software* (Applied Maths).

#### **2.4. Tipificação pela técnica de rep-PCR**

A técnica de rep-PCR (*Repetitive element sequence-based polymerase chain reaction*) foi realizada por metodologia proposta por Svec *et al.* (2010), utilizando o oligonucleotídeo (GTG)<sub>5</sub> como *primer* - (5' GTG GTG GTG GTG GTG-3'). Os perfis de DNA obtidos pelo (GTG)<sub>5</sub>-PCR foram analisados pelo programa GelJ 2.0 conforme descrito por Heras *et al.* (2015). Os valores de similaridade genética foram calculados pelo coeficiente de Pearson e utilizados para gerar um dendrograma de similaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Amostras com perfis semelhantes de GTG-*fingerprinting* (semelhança superior a 90%) foram consideradas geneticamente relacionadas.

#### **2.5. Tipificação proteômica**

As amostras foram submetidas à técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) - *time of flight* (TOF) *Mass Spectrometry* (MS) e os espectros gerados foram analisados usando o MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik, Billerica, MA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Baseando-se nos valores obtidos da comparação de pares de diferentes espectros, um dendrograma MSP foi gerado usando o método padrão de criação BioTyper MSP, permitindo a visualização de semelhanças entre os perfis de espectros. Os *clusters* foram então detalhados e analisados de acordo com nível de distância arbitrário de 250.

#### **2.6. Concordância**

A concordância mede a probabilidade de dois sistemas de tipificação diferentes concordarem se um par de amostras selecionadas aleatoriamente é do mesmo tipo ou de tipos diferentes. Assim, concordância, expressa em porcentagem, corresponde à proporção de pares

para os quais os dois métodos estão de acordo. Um valor de concordância de 1 indica que os dois sistemas de tipagem sempre concordam em como classificar um par de isolados; um valor de concordância de 0 significa que os dois sistemas de digitação sempre discordam. As estimativas de concordância entre os tipos de *spa*, (GTG)<sub>5</sub> e MALDI-TOF foram avaliadas conforme Robinson *et al* (1998).

## **2.7. Poder discriminatório**

O índice discriminatório (ID) mede a probabilidade de um método de tipificação atribuir um tipo diferente a duas amostras aleatoriamente amostradas de uma população microbiana. Um ID de 1 indica uma comunidade completamente diversa, enquanto um ID de 0 indica uma comunidade composta inteiramente de um único clone. IDs foram calculados para *spa*, (GTG)<sub>5</sub> e MALDI-TOF por meio do índice de diversidade de Simpson conforme Hunter e Gaston (1988) e os intervalos de confiança como descrito por Grundmann *et al.* (2001).

## **2.8. Tipabilidade**

A tipabilidade diz respeito à proporção de amostras que são atribuídas a um tipo por um sistema de tipificação e foi calculada conforme descrito por Struelens (1996).

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## ***3.1. Identificação genética das amostras***

Todas as 76 amostras identificadas bioquimicamente como *Staphylococcus aureus* tiveram identificação confirmada pela PCR para amplificação do gene da term nuclease (*nuc*) e do gene *16S rRNA*. O gel da figura 1 apresenta as bandas específicas compatíveis com *S. aureus*.

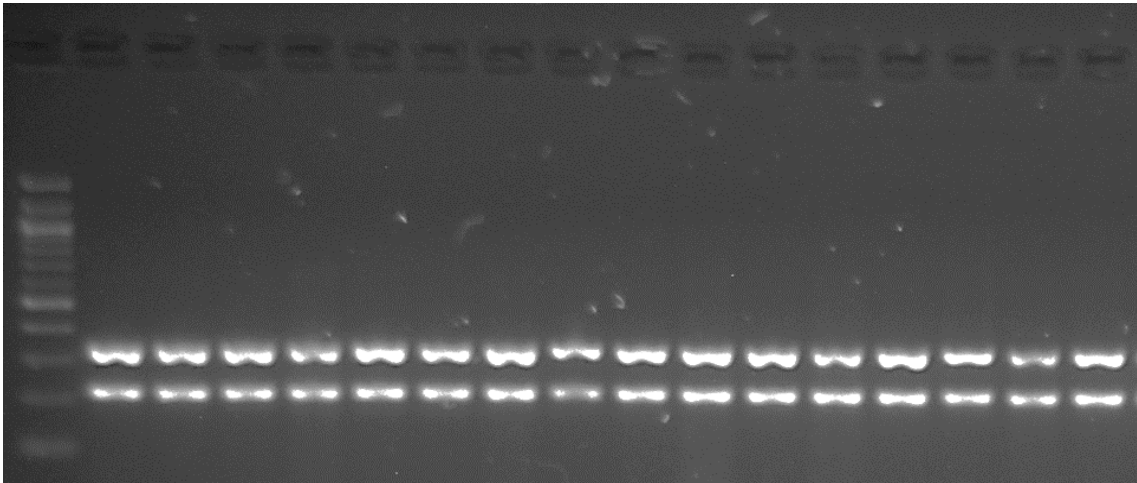


Figura 1- Gel com as bandas específicas compatíveis com *Staphylococcus aureus* (359 pb- gene *nuc* e 228 pb- gene *16S rRNA*). Ladder de 100 bp

### 3.2. Tipificação pelo método de amplificação e sequenciamento de *spa*

Do total de 76 amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas, foi possível realizar a amplificação da região X do gene da proteína A de 74 amostras e o tamanho de bandas obtidos foi entre 200 e 450 bp (Figura 2). As 74 amostras sequenciadas no estudo foram agrupadas em 13 tipos de *spa* diferentes (Figura 3). Em sete amostras analisadas, o Bionumerics não foi capaz de determinar o tipo de *spa*, sendo essas sequências determinadas de *Unknown*.

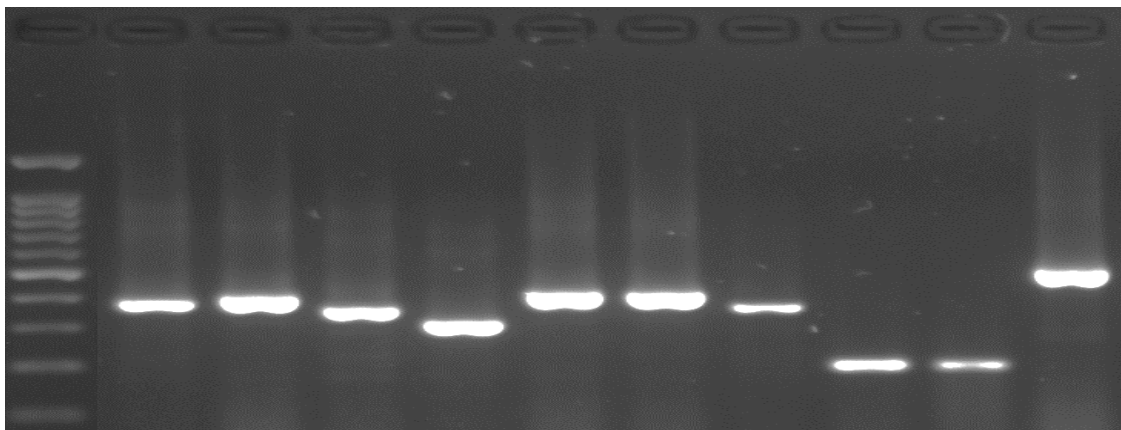


Figura 2. Resultado da amplificação da região X do gene da proteína A. Ladder de 100pb.

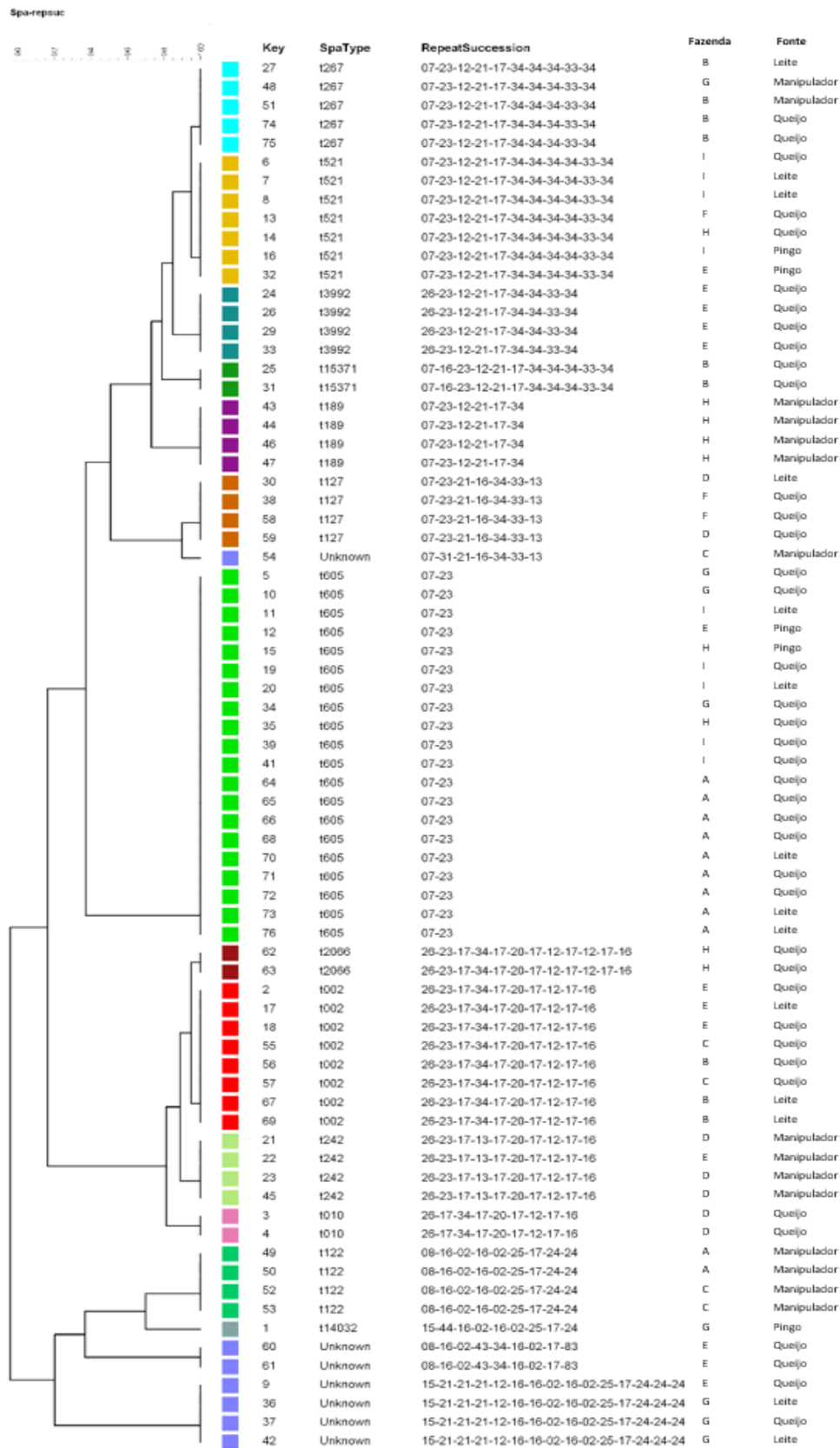


Figura 3. Dendrograma das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de sequenciamento do gene *spa* com os respectivos dados de genótipo, fazenda e fonte de coleta

A alta diversidade genética encontrada no nosso estudo indica que a contaminação do produto final (queijo Minas artesanal) com *S. aureus* pode ter origem em diferentes fontes. De fato, no nosso estudo, um mesmo tipo de *spa* foi detectado em fontes diferentes dentro de uma mesma fazenda, como é o caso do t605, t267 e t521, o que corrobora essa afirmativa. Por outro lado, alguns tipos de *spa* foram detectados exclusivamente em um único tipo de fonte e de fazenda, como o genótipo t3992 detectado exclusivamente no queijo da fazenda E, o t15371 identificado somente em queijo da fazenda B, o t010 identificado exclusivamente em queijo da fazenda D e o t2066 apenas em queijo da fazenda H, revelando uma adaptação destes genótipos à realidade local de produção do QMA nas fazendas supramencionadas.

O genótipo de maior frequência no estudo foi o t605 (27%), seguido pelos tipos t002 (10,8%) e t521 (9,5%) (Gráfico 1). O tipo t605 foi predominante em amostras de queijo, encontrado nas fazendas A, I, G e H, sendo também detectado em amostras de leite (fazendas A e I) e de soro-fermento (fazendas E e H) (Figura 3). A maior prevalência de t605 no nosso estudo sugere que este genótipo possa ser endêmico na região estudada.

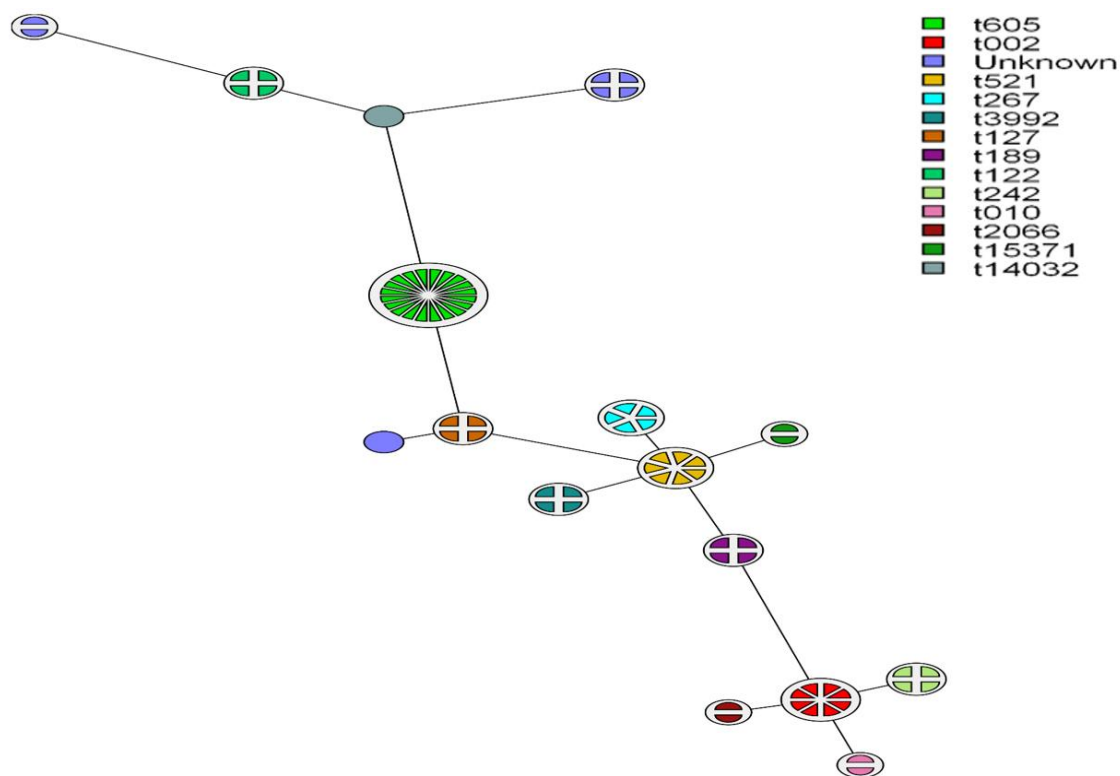


Gráfico 1. *Minimal spanning tree* (MST) de 74 amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas por *spa* typing de acordo com os genótipos identificados



Em estudo realizado em três diferentes plantas processadoras de queijo Minas frescal no Estado de São Paulo, Brasil, o genótipo t605 foi detectado com alta frequência e em amostras de todos os laticínios, à semelhança do nosso estudo (Rodrigues *et al.*, 2017). Rabello *et al.* (2007) ao estudar *Staphylococcus aureus* provenientes de mastite bovina no sudeste brasileiro relatou o tipo t605 como o mais frequente em seu estudo. Aires-de-Sousa *et al.* (2007), Silva *et al.* (2013) e Bonsaglia *et al.* (2018) também relataram a alta prevalência de t605 em amostras de leite no rebanho brasileiro, concluindo que este genótipo parece ser melhor adaptado ao hospedeiro das regiões avaliadas.

À semelhança do nosso estudo, em trabalho realizado por Luo *et al.* 2018, o genótipo t002 foi o segundo de maior ocorrência (10,55%) em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas e de alimentos na China. No nosso estudo, este genótipo foi predominante em amostras de queijo (fazendas B, C e E), sendo também detectado em leite cru (fazendas B e E).

O terceiro genótipo mais frequente em nosso estudo, o t521, foi encontrado em leite cru, queijo e pingo da fazenda I, revelando a disseminação deste genótipo na cadeia produtiva do queijo Minas artesanal desta fazenda. À semelhança dos nossos resultados, em estudo realizado ao longo do processo de produção de queijo elaborado com leite cru em laticínios artesanais na Itália, Johler *et al.* (2018) identificaram o genótipo t521 em amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo artesanal e soro-fermento.

O genótipo t267 foi quase que exclusivamente detectado apenas na fazenda B, sendo isolado de queijo, manipulador e leite desta fazenda. A identificação deste genótipo em diferentes fontes dentro da cadeia de produção do queijo Minas artesanal sugere a ocorrência de contaminação cruzada. A identificação do mesmo tipo de *spa* em *S. aureus* de origem humana e animal ainda demonstra a possível disseminação entre estes dois reservatórios. Estes achados reforçam a importância da qualidade microbiológica do leite cru e da higiene pessoal do manipulador na qualidade microbiológica final do queijo Minas artesanal.

O tipo t267 também foi isolado ao longo do processo de produção de queijo elaborado com leite cru em laticínios artesanais na Itália, sendo detectado na massa coagulada, na salmoura,

na bancada de maturação e no queijo (Johler *et al.*, 2018). Este genótipo foi descrito por Aires-de-Sousa *et al.* (2007) como predominante no rebanho de vacas com mastite no Brasil. Além disso, tem sido considerado um possível clone ancestral de outros tipos de *spa* envolvidos na mastite clínica bovina na Índia, além de se associar ao primeiro relato de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de leite bovino neste país (Mitra *et al.*, 2013; Bhattacharyya *et al.*, 2016).

O tipo t189 foi identificado apenas em manipuladores da fazenda H. Este genótipo tem sido associado à alta ocorrência de identificação em portadores persistentemente colonizados e tem sido comumente isolado de infecções humanas no Sudeste Asiático (Ho *et al.*, 2015). Estudos demonstram que a maioria das contaminações das mãos é atribuível a contaminação cruzada de manipuladores persistentemente colonizados por *Staphylococcus aureus*, que presumivelmente contaminam o meio ambiente (Kishimoto *et al.*, 2004; Wertheim *et al.*, 2005). Isso enfatiza a importância do achado deste genótipo em manipuladores no nosso estudo e a necessidade de práticas adequadas de limpeza e de desinfecção do ambiente, além da necessidade de lavagem das mãos, ou de uso adicional de luvas e máscaras por manipuladores de alimentos para reduzir a transmissão deste micro-organismo a outros manipuladores de alimento.

Outros dois genótipos identificados no nosso estudo também foram exclusivamente obtidos de manipuladores do queijo Minas artesanal: o t242, identificado em manipuladores das fazendas E e D, e o t122, isolado de manipuladores das fazendas A e C.

O t242 é um clone epidêmico humano comum e é considerado o tipo de *spa* mais prevalente em amostras clínicas na América (Asadollahi *et al.*, 2018). Este genótipo foi associado à causa mais comum de infecção hospitalar no Canadá (Christianson *et al.* 2007), além de ser a amostra mais comumente encontrada em humanos infectados nos Estados Unidos (Tenover *et al.* 2008).

Em nosso estudo, o tipo t14032 foi identificado em apenas uma amostra de soro-fermento, e este parece ser o primeiro relato deste genótipo neste produto no mundo. Em consulta ao banco de dados SeqNet/Ridom Spa Server (<http://www.spaserver.ridom.de/>), há um único registro deste

genótipo no sistema, sendo este tipo descrito como uma amostra de *Staphylococcus aureus* susceptível à meticilina (MSSA).

### 3.3. Spa x (GTG)<sub>5</sub>- Poder discriminatório, concordância e tipabilidade

Todas as amostras analisadas foram tipificáveis utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> e os produtos de PCR variaram entre 250 e 5.000 pb. Assim, a tipabilidade pelo método GTG<sub>5</sub> (100%) foi superior ao *spa typing* (97%), no qual duas amostras não foram atribuídas a um tipo específico (Tabela 1).

Tabela 1. Tipabilidade, nível de classificação, poder discriminatório e concordância dos métodos de tipificação (GTG<sub>5</sub>, SPA typing e MALDI TOF- MS) aplicados nas amostras de *Staphylococcus aureus*

Técnica	Tipabilidade (%)	Nível de classificação		Poder discriminatório <sup>b</sup> (95% IC)	Concordância <sup>c</sup>		
		Nº	Mais frequente (%)		(GTG) <sub>5</sub>	SPA typing	MALDI TOF- MS
(GTG) <sub>5</sub>	100	19	12	0,926 (0,907 - 0,945)		0,735 (0,651- 0,819)	0,310 (0,212- 0,408)
SPA typing	97 <sup>a</sup>	16	27	0,893 (0,849 – 0,937)	0,509 (0,422- 0,596)		0,294 (0,210- 0,378)
MALDI TOF-MS	100	12	36	0,755 (0,703 – 0,807)	0,094 (0,051- 0,136)	0,128 (0,071- 0,186)	

<sup>a</sup> Duas amostras não foram atribuídas a um tipo de *spa*; <sup>b</sup> O Índice Discriminatório (Índice de Diversidade de Simpson) e seus intervalos de confiança foram calculados usando uma ferramenta on-line desenvolvida por Pinto *et al.* (2008); <sup>c</sup> A concordância (coeficiente de Wallace) e seus intervalos de confiança foram calculados com base nas 74 amostras tipificadas por todos os métodos, utilizando uma ferramenta on-line desenvolvida por Pinto *et al.* (2008)

A maioria das amostras mostrou um perfil de impressões digitais próximo, revelando um alto grau de similaridade genética (Figura 4). Contudo, a variabilidade na presença de algumas bandas influenciou a análise final de *cluster* e 19 agrupamentos se formaram, considerando um ponto de corte de 90% de similaridade genética, sendo os *clusters* 3 e 5 os mais frequentes (12%).

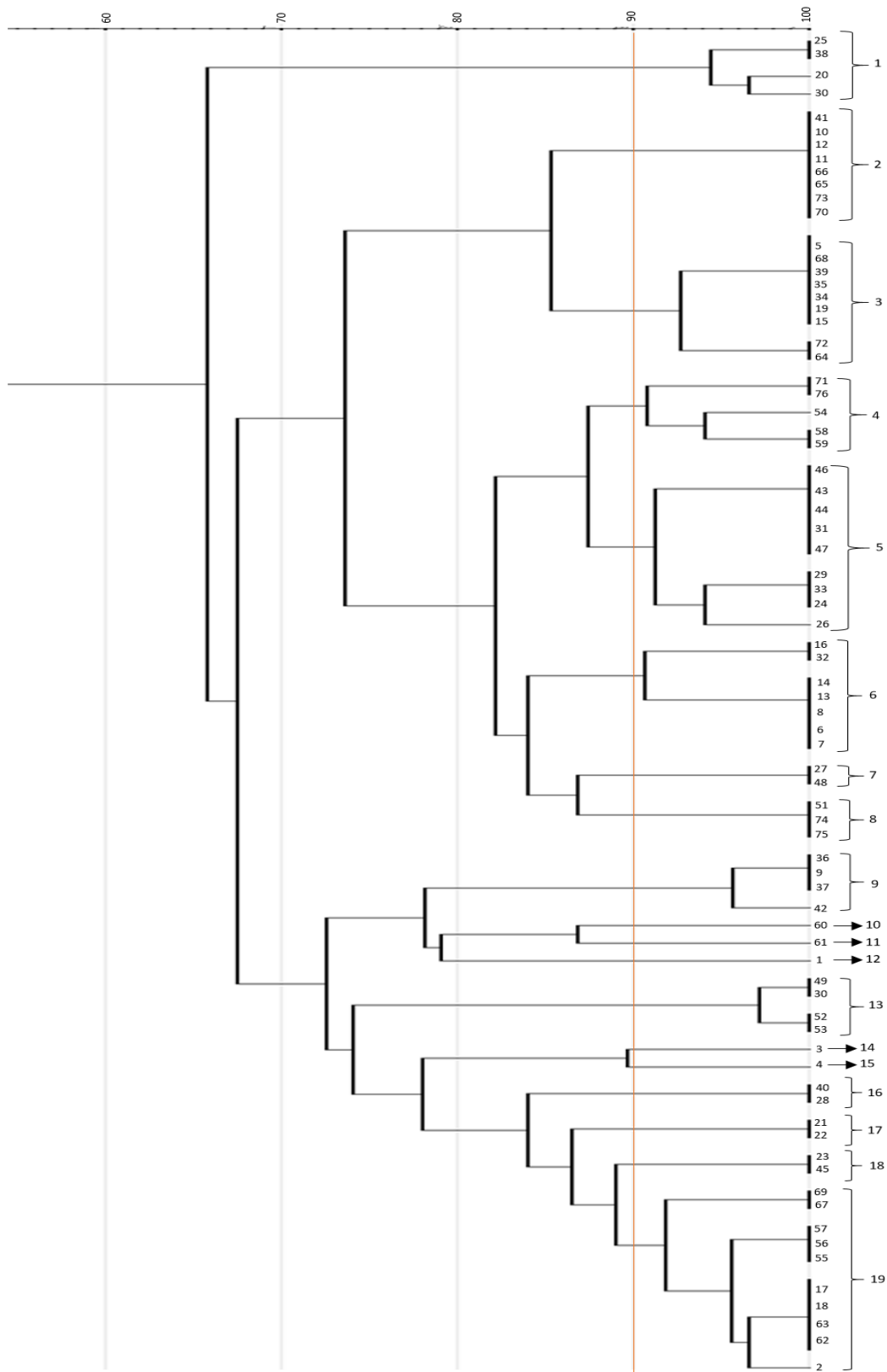


Figura 4. Dendrograma das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de *rep-PCR*.

Assim como no *spa typing*, um mesmo perfil foi encontrado em diferentes fontes e fazendas no nosso estudo, revelando a importância da microbiota das matérias-primas, leite e

pingo, e dos manipuladores na composição da microbiota final do queijo Minas artesanal. Entretanto, o método de agrupamento pelo  $(GTG)_5$  foi superior ao *spa typing* em atribuir um tipo diferente a duas amostras aleatoriamente amostradas em nosso estudo, o que resultou em um poder discriminatório do método  $(GTG)_5$  (0.926) superior ao do *spa typing* (0.893) (Tabela 1). Assim, as amostras 27 e 48 que pertenciam ao mesmo tipo de *spa typing* (t267) das amostras 51, 74 e 75, por exemplo, pelo método do  $(GTG)_5$  foram agrupadas separadamente destas. O mesmo foi observado com as amostras 21 e 22 que pertenciam ao mesmo tipo de *spa typing* (t242) das amostras 23 e 45 e que pelo método do  $(GTG)_5$  foram agrupadas separadamente destas, apresentando aproximadamente 88% de similaridade genética entre os dois *clusters* formados (Figura 4). Entretanto, apesar de o resultado supramencionado, é importante salientar que ao comparar dois métodos de tipagem quanto ao poder discriminatório, é necessário comparar os intervalos de confiança encontrados para cada técnica analisada. Assim, se eles se sobrepõem, não se pode excluir a hipótese de que ambos os métodos têm poder discriminatório semelhante (com nível de confiança de 95%).

O método  $(GTG)_5$  apresentou concordância de 73,5% com o *spa typing*, enquanto este apresentou 50,9% de concordância com o método  $(GTG)_5$ . Isto quer dizer que as amostras do nosso estudo agrupadas em um mesmo cluster do  $(GTG)_5$  possuem 73,5% de chance de ter o mesmo tipo de *spa*, enquanto inversamente, a possibilidade disto ocorrer é de 50,9%. Estes dados refletem o fato de que o  $(GTG)_5$  foi mais discriminatório que o *spa typing* e os grupos  $(GTG)_5$  subdividirem os tipos T.

### **3.4. Spa x MALDI TOF MS- Poder discriminatório, concordância e tipabilidade**

Todas as amostras analisadas foram tipificáveis utilizando o MALDI-TOF. Assim, a *tipabilidade* por este método (100%) foi superior ao *spa typing* (97%), no qual duas amostras não foram atribuídas a um tipo específico (Tabela 1). O dendrograma MSP ainda revelou 12 *clusters*

distintos de acordo com um corte arbitrário ao nível de distância de 250, o que resultou em um poder discriminatório deste método (75,5%) inferior ao spa typing (0.893) (Figura 5).

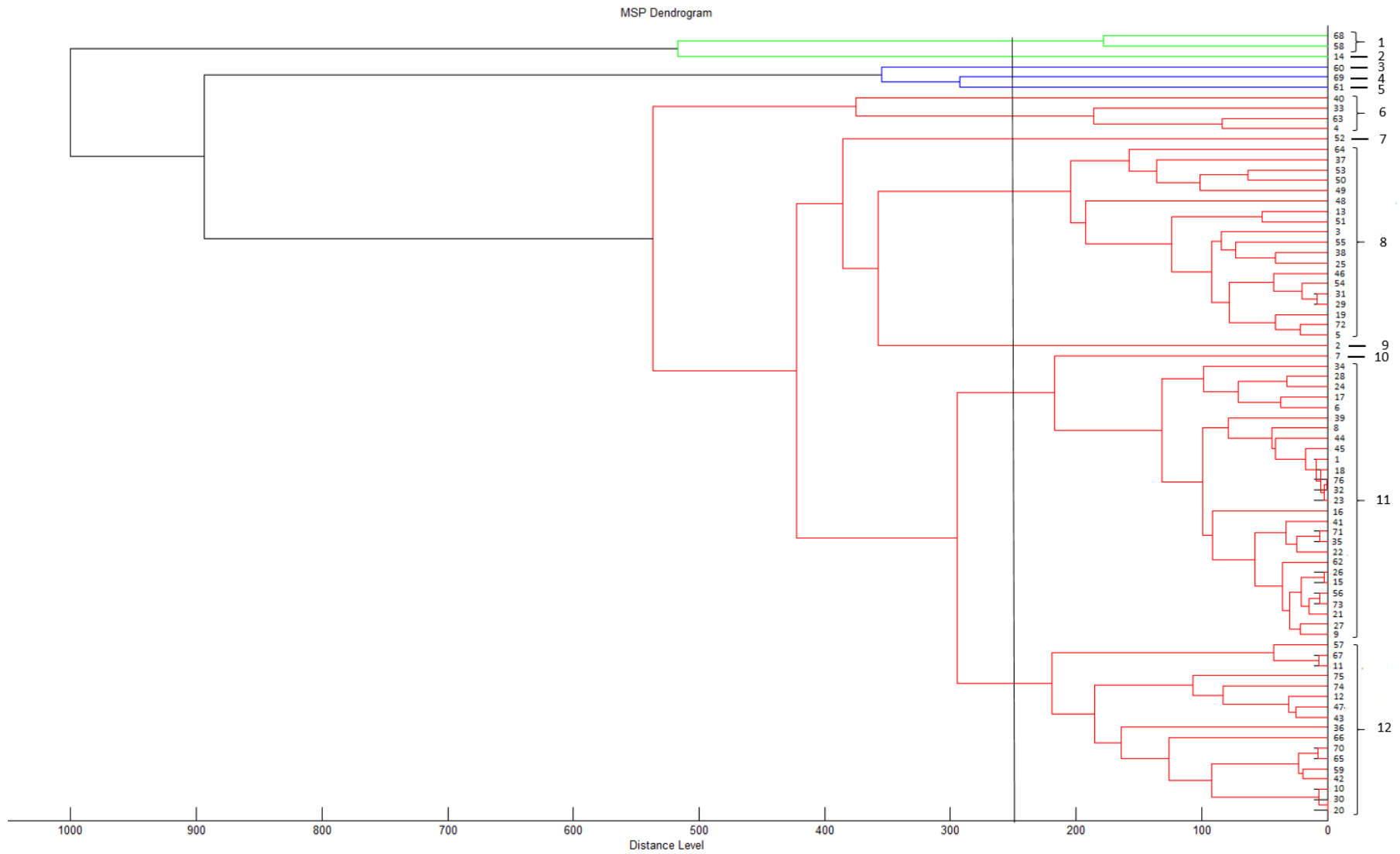


Figura 5. Dendrograma (MSP) das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de MALDI-TOF MS considerando o nível de distância arbitrário de 250



Comparando os *clusters* obtidos a partir do dendrograma MSP (Figura 5) com a distribuição das amostras do *spa* typing (Figura 3), notamos uma baixa correlação entre os dois métodos, que se reflete na baixa concordância obtida entre estes pelo coeficiente de Wallace (MALDI TOF → *spa* typing = 12,8% e *spa* typing → MALDI TOF= 29,4%). Resultado semelhante foi descrito por Rim *et al.* (2015) ao comparar a correlação da tipificação de amostras de *Acinetobacter baumannii* pelo método de MALDI TOF com a técnica de PFGE. Nesse estudo, os autores observaram que isolados muito próximos no dendrograma do MALDI- TOF apresentavam padrões de banda na PFGE completamente diferentes, concluindo que o poder discriminatório do MALDI-TOF encontrado (44,9% e 29,7%) é insuficiente para determinar a clonalidade de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas amostras clínicas.

Além disso, a tipificação de *Staphylococcus aureus* pelo MALDI-TOF no nosso estudo não indicou uma relação esperada entre os clusters obtidos com os dados de fonte e de fazenda das amostras analisadas como o *spa* typing indicou, no qual foi agrupado em um mesmo cluster amostras pertencentes à mesma fonte e fazenda. Resultado semelhante foi descrito por Berrazeg *et al.* (2013) ao comparar a tipificação pelo MALDI-TOF com a técnica de MLST de amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiplos fármacos isolados da França e da Argélia.

As impressões digitais geradas pelo MALDI-TOF MS são claramente diferentes dos dados genômicos gerados pela amplificação e sequenciamento do gene *spa*. Enquanto o último tem uma natureza essencialmente digital, os picos originários da espectrometria de massa refletem dados em forma de onda que são mais análogos por natureza e fortemente influenciados por fatores analíticos. Assim, a presença x ausência de picos, a relação m/z e os níveis de intensidade (relativa) dos picos, parâmetros usados para a tipagem de micro-organismos pela técnica de MALDI-TOF MS, estão sujeitos a grande erro analítico e a variações biológicas e de técnica, muitas vezes complexas, como baixo nível/expressão proteica e ocorrência de modificações pós-traducionais ou na regulação da expressão das proteínas (Spinali *et al.*, 2015).

A técnica de *spa typing* e a tipagem pelo MALDI TOF MS medem aspectos bacterianos completamente diferentes. Enquanto o primeiro registra as propriedades de um único gene conservado que determina a síntese de uma proteína de superfície celular de *Staphylococcus aureus*, o que reflete o genoma central do micro-organismo (menos de 10% do genoma total), a última registra todas as proteínas intracelulares e ligadas à parede celular do micro-organismo, incluindo as determinadas por mutações pontuais em reguladores como *agr* ou *sar* e pela aquisição de elementos genéticos móveis, que são compostos por genes acessórios. Estes, por sua vez, representam todo o restante do genoma (90%), sendo assim os principais responsáveis pelo fenótipo bacteriano e pela classificação bacteriana (Dieckmann *et al.*, 2008; Diene *et al.*, 2012). Assim, o genoma central refletido pela análise de *spa typing* não representa a maioria das proteínas expressas, em contraste com a análise do dendograma MSP, que é baseada nas proteínas funcionais e expressas de células inteiras, sendo mais representativas do fenótipo global, embora é sabido que os espectros de massa microbianos de MALDI TOF contêm grandes frações (~ 60-70%) de sinais provenientes de proteínas de subunidades ribossômicas e que são fortemente influenciados pela expressão diferencial dessas proteínas em diferentes linhagens (Arnold and Reilly, 1999; Berrazeg *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2013).

### **3.5. (GTG)<sub>5</sub> x MALDI-TOF MS - Poder discriminatório, concordância e tipabilidade**

Ambos os métodos foram capazes de atribuir um tipo específico a todas as amostras analisadas, apresentando tipabilidade de 100%. Entretanto, o método do (GTG)<sub>5</sub> apresentou um poder discriminatório (92,6%) superior ao *spa typing* (75,5%), por atribuir mais tipos diferentes a duas amostras aleatoriamente amostradas em nosso estudo (Tabela 1). Resultado semelhante foi encontrado por Doan *et al.* (2012) em estudo realizado com produtos fermentados tradicionais do norte do Vietnã, no qual o método do (GTG)<sub>5</sub> indicou maior poder discriminatório que o MALDI-TOF na análise de cluster de bactérias do ácido láctico (Doan *et al.*, 2012).

À semelhança dos resultados encontrados na comparação da tipificação pelo MALDI-TOF com *spa typing*, não encontramos em nosso estudo uma correlação entre os clusters obtidos a partir do dendrograma MSP (Figura 5) com a distribuição das amostras pelo agrupamento usando os primers  $(GTG)_5$  (Figura 4). Prova disto, que o método  $(GTG)_5$  apresentou concordância de 31% com o MALDI-TOF, enquanto este apresentou 9,4% de concordância com o método  $(GTG)_5$ , a menor encontrada no nosso estudo.

O poder discriminatório do MALDI-TOF parece ser táxon-dependente (Ghyselinck *et al.* 2011). Assim, em estudo realizado por Ghyselinck *et al.* (2011) com amostras bacterianas soladas da rizosfera de batata no Peru e na Bolívia, o MALDI-TOF apresentou maior poder discriminatório que o  $(GTG)_5$  quando isolados pertencentes aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, e *Pseudomonas* foram analisados, enquanto o contrário foi observado na análise de *cluster* de isolados pertencentes *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Paenibacillus* e *Arthrobacter*, no qual o  $(GTG)_5$  apresentou maior poder discriminatório que o MALDI-TOF. Da mesma forma a capacidade que o MALDI-TOF apresenta de diferenciar os micro-organismos ao nível de gênero, espécie e linhagem é também táxon-dependente. Prova disto que a análise MALDI-TOF MS discriminou subespécies de *Francisella tularensis* (Seibold *et al.*, 2010) e diferenciou com êxito linhagens de *Legionella* epidemiologicamente relacionadas (Fujinami *et al.*, 2009). Contudo, o MALDI-TOF MS não conseguiu diferenciar a subespécies *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com base em seus espectros de massa (Tanigawa *et al.*, 2010).

Embora o MALDI-TOF detecte um grande espectro de proteínas, a maioria das proteínas e fragmentos detectados pelo MALDI-TOF na faixa de 2000 a 20 000 Da tem origem ribossomal (Arnold and Reilly, 1999; Suarez *et al.*, 2013). Sabe-se que as proteínas ribossômicas são de natureza altamente conservadas, sendo pouco influenciadas pelas condições de cultura (temperatura de crescimento, meio, incluindo agar sólido e tipos de caldo) (Wieme *et al.*, 2014). Assim, a análise do espectro gerado por essas proteínas é capaz de discriminar com alta eficiência espécies estreitamente relacionadas. Entretanto, para a discriminação de micro-organismos ao

nível de linhagem, é necessária a análise de diferenças espectrais muito menores em comparação à caracterização ao nível das espécies, ou mesmo do gênero, de forma que não se pode excluir o fato de que a divergência de diferenciação de linhagens pela técnica de rep-PCR e pela técnica de MALDI-TOF pode ter sido baseada em condições de cultura inadequadas (Sandrin *et al.*, 2013).

#### 4. CONCLUSÕES

As amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes apresentaram alta diversidade genética e há indícios de que a presença desse micro-organismo no produto final seja resultado da contaminação cruzada do leite cru, do soro-fermento (pingo) e dos manipuladores assintomáticos desse agente bacteriano. A detecção de clones bacterianos previamente associados a doenças humanas reforça a necessidade de uma melhor caracterização do risco microbiológico relacionado a queijos elaborados com leite cru e destaca a importância da implementação das boas práticas de fabricação para reduzir o risco de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas ao longo da cadeia alimentar. Os métodos de tipificação baseados em abordagem genômica no nosso estudo apresentaram alto poder discriminatório para as amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas. Entretanto, nossos dados indicam que a análise proteômica dos picos de proteína pertencentes a uma faixa de 2kDa a 20kDa difere fortemente da análise genômica dos métodos de caracterização molecular (*spa typing* e *Rep-PCR*), considerando a tipagem das amostras de *Staphylococcus aureus* neste estudo, o que refletiu em um limitado poder discriminatório da técnica de MALDI-TOF MS.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-DE-SOUSA, M., PARENTE C. E. S. R.; VIEIRA-DA-MOTTA BONNA, O *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro state, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3845–3849, 2007.

ARNOLD, R.J. E REILLY, J.P. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 269: 105– 112, 1999.

ASADOLLAHI, P.; FARAHANI, N.N.; MIRZAI, M. *et al.* Distribution of the Most Prevalent *Spa* Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. *Front Microbiol.* 9:163, 2018.

BARAN, A.; ERDOGAN, A.; TURGUT, T. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. *Tr. Doğa ve Fen Derg.-Tr. J. Nature Sci.* 6: 100-105, 2017.

BARBUDDHE, S. B.; MAIER, T.; SCHWARZ, G. *et al.* Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74 , pp. 5402-5407, 2008.

BERRAZEG, M.; DIENE, S. M.; DRISSI, M. *et al.* Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS ONE* 8:e61428, 2013.

BERRAZEG, M.; SEYDINA, M. D.; DRISSI, M. *et al.* Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. *PLoS One.* 8 (4): e61428, 2013.

BHATTACHARYYA, D.; JAYDEEP, B.; SAMIRAN, B. First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microb. Drug Resist.* 22(8):675-681, 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.

BROWN, A. F.; LEECH, J. M.; ROGERS, T. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.*, v. 4, n. p.507, 2014.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campodas Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *J. Dairy Sci.* v. 99, n.8, p. 6086-6096, 2016.

CHRISTIANSON, S.; GOLDING, G. R.; CAMPBELL, J. the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program., Mulvey MR (2007) Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 45:1904–1911, 2007.

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S. *et al.* The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infec.*, v.13, n.3, p.222-235, 2007.

DIECKMANN, R.; HELMUTH, R.; ERHARD, M. *et al.* Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74: 7767–7778 AEM.01402-08, 2008.

DIENE, S. M.; MERHEJ, V.; HENRY, M *et al.* The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “killer bugs” are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol.* mss236 [pii];10.1093/molbev/mss236 [doi], 2012.

DOAN, N. T. L.; HOORDE, K. V.; CNOCKAERT, M. *et al.* Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Lett Appl Microbiol.* n.4: 265–273, 2012.

FAN H. H.; KLEVEN S. H. e JACKWOOD M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, v. 39, p.729-735, 1995.

FUJINAMI, Y.; KIKKAWA, H.S.; KUROSAKI, Y. *et al.* Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2009.

GHYSELINCK, J.; HOORDE, K. V.; HOSTE, B. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication. *J. Microbiol. Methods* 86, 327–336, 2011.

GRUNDMANN, H.; HORI, S. E TANNER, G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39:4190–4192, 2001.

HARMSSEN, D.; CLAUS, H.; WITTE, W. *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 12, p. 5442-5448, 2003.

HERAS J, DOMÍNGUEZ C, MATA E, *et al.* GelJ--a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 16:270, 2015.

HU, H. C.; KAO, K. C.; CHIU, L. C. *et al.* Clinical outcomes and molecular typing of heterogenous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients in intensive care units. *BMC Infect Dis.* 2015;15:444, 2015.

HUNTER, P. R., E GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465–2466, 1988.

- JOHLER, S.; MACORI, G.; BELLIO, A. *et al.* *Short communication: Characterization of Staphylococcus aureus isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. J. Dairy Sci.* 101: 2915- 2920, 2018.
- JOHLER, S.; MACORI, G.; BELLIO, A. *et al.* Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *J Dairy Sci.* 101(4):2915-2920, 2018.
- KIM, S. W.; NHO, S. W.; IM, S. P. *et al.* Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae*. *J. Microbiol.* 55, 260–266, 2017.
- KISHIMOTO, M.; HIOKI, Y.; OKANO, T. *et al.* Ribotyping and a study of transmission of *Staphylococcus aureus* collected from food preparation facilities. *J Food Protec.* n.6. p.1116-1122, 2004.
- KOREEN, L.; RAMASWAMY, S.V.; GRAVISS, E.A.; *et al.* Spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J. Clin. Microbiol* v. 42 n. 2, p.792-799, 2004.
- LIU, M.; LU, J.; MÜLLER, P. *et al.* Antibiotic-specific differences in the response of *Staphylococcus aureus* to treatment with antimicrobials combined with manuka honey. *Front. Microbiol.* 5:779. 2015.
- LUO K.; SHAO F.; KAMARA K. N. *et al.* Molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolates derived from clinical infection and food. *J Clin Lab Anal.* 32(7):e22456, 2018.
- MACCANNELL, D. Bacterial Strain Typing. *Clin. Lab. Med.*, v.33, p. 33: 629-650, 2013.
- MANGA, I. e VYLETĚLOVÁ, M. Rep-PCR-based typing as a tool for tracking of MRSA infection origin. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* n.6, pp. 251–256, 2012.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; Pimentel-Filho, N. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Braz. J. Microbiol.* vol. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.
- MENCACCI, A.; MONARI, C.; LELI, C., *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin.* 51, 603-606, 2013
- MITRA, S.; VELU, D.; BHUVANA, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. *J Appl Microbiol.* n.6:1604-15. 2013.
- MONDAY, S. R.; BOHACH, G.A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 37: 3411–3414, 1999.

O'HARA F. P.; SUAYA, J. A.; RAY, G. T. *et al.* spa Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microb Drug Resist.* 22(1):88-96, 2016.

ONO, H.K.; SATO'O, Y.; NARITA, K. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7034-7040, 2015.

PINTO, F.R.; MELO-CRISTINO, J. E RAMIREZ, M. A confidence interval for the wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS One* 3:e3696, 2008.

RABELLO, R. F., B. M.; MOREIRA, LOPES, R. M. M.; TEIXEIRA, L. M. *et al.* Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.* 56:1505–1511, 2007.

RIM, J. H.; LEE Y.; HONG, .K. *et al.* Insufficient Discriminatory Power of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Dendrograms to Determine the Clonality of Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from an Intensive Care Unit. *BioMed Res. Int.* Article ID 535027, 8 pages, 2015.

ROBINSON, D. A.; HOLLINGSHEAD, S. K.; MUSSER, J. M. *et al.* The IS1167 insertion sequence is a phyloge-netically informative marker among isolates of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Evol.* 47:222–229, 1998.

RODRIGUES J. B.; PINTO, T. S.; OLIVEIRA, C. P. *et al et al.* Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human wounds, animals, foods, and food-contact surfaces in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8 1015–1058, 2015.

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.

ROSS, T. L.; FUSS, E. P.; HARRINGTON, S. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 43, 363–367, 2005.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* n.3: 188–217, 2013.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. *et al.* Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, n. 3, p. 765–9, 2010.

SEIBOLD, E.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M. *et al.* Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 48:1061–1069, 2010.



SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; MONTGOMERY, S. O. *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* v.37, p. 3556–3563, 1999.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* n.6, 791, 2015.

SOPHIA, J.; DELPHINE, W.; CLAUDE, B. *et al.* Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* n. 2944-2948, 2015.

SPINALI, S.; BELKUM, A. V.; GOERING, R. V. *et al.* Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation? *J Clin Microbiol.* n.3: 760–765, 2015.

STRUELENS, M. J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2:2–11, 1996.

SUAREZ, S.; FERRONI, A.; LOTZ, A. *et al.* Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods* 94, 390–396, 2013.

SVEC, P.; PANTUCEK, R.; PETRÁS, P. *et al.* Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.* v.33, p. 451-456, 2010.

TANIGAWA, K.; KAWABATA, H E WATANABE, K. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 76:4055– 4062, 2010.

TENOVER, F. C. E GOERING, R. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 64(3): 441–446, 2009.

VERHOEVEN P. O.; GAGNAIRE J.; BOTELHO-NEVERS E. *et al.* Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12 75–89, 2014.

WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C. *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* n.12:751-62, 2005.

WIEME, A. D.; SPITAELS, F.; AERTS, M. *et al.* Identification of beer-spoilage bacteria using matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 41–50, 2014.

**ANEXO 1. Fatores de patogenicidade e perfil de *clusters* das amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil**

Amostra	Origem	Fazenda	Fenotípico		PCR convencional					Cluster						
			Dnase	Ferm. do Manitol	<i>agr</i>	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>tsst-1</i>	qRT-PCR	AVC	Hemolisina	OSP	Biofilme/ Placa	GTG <sub>5</sub>	<i>spa</i>	MALDI 250
1	Pingo	G	+	+	+	-	-	-	-	+	$\alpha$	-	Moderadamente	12	14	2
2	Queijo	E	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	19	10	3
3	Queijo	D	+	+	+	+	+	+	+ TSST; + C; - A	+	$\gamma$	-	Fracamente	14	12	4
4	Queijo	D	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	15	12	6
5	Queijo	G	+	+	+	+	-	-	+ A	-	$\alpha$	-	Fracamente	3	8	4
6	Queijo	I	+	-	+	+	-	+	+ TSST; - A	+	$\gamma$	-	Fracamente	6	2	2
7	Leite	I	+	+	+	+	-	+	+ TSST; + A	+	$\gamma$	-	Não aderente	6	2	2
8	Leite	I	+	+	+	+	-	-	- A	+	$\gamma$	-	Fracamente	6	2	2
9	Queijo	E	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	9	16	2
10	Queijo	G	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	2	8	1
11	Leite	I	+	+	+	-	+	-	- C	-	$\gamma$	-	Fracamente	2	8	1
12	Pingo	E	+	+	-	-	-	+	+ TSST	+	$\gamma$	+ TSST	Fracamente	2	8	1
13	Queijo	F	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	6	2	4
14	Queijo	H	+	-	+	-	-	+	+ TSST	+	$\gamma$	-	Fracamente	6	2	11
15	Pingo	H	+	-	+	+	-	-	+ A	-	$\beta$	-	Fracamente	3	8	2
16	Pingo	I	+	+	+	+	-	-	+ A	+	$\beta$	-	Fracamente	6	2	2
17	Leite	E	+	+	+	+	-	-	+ A	-	$\gamma$	-	Fracamente	19	10	2
18	Queijo	E	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	19	10	2
19	Queijo	I	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	3	8	4
20	Leite	I	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Fracamente	1	8	1
21	Manipulador	D	-	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Moderadamente	17	11	2
22	Manipulador	E	-	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	17	11	2

23	Manipulador	D	+	+	+	-	-	-	-	+	$\alpha$	-	Fracamente	18	11	2
24	Queijo	E	+	+	+	-	-	-	-	+	$\alpha$	-	Fracamente	5	3	2
25	Queijo	B	+	-	+	+	-	-	+ A	+	$\gamma$	-	Fracamente	1	4	4
26	Queijo	E	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	5	3	2
27	Leite	B	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	7	1	2
28	Queijo	B	+	-	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	16		2
29	Queijo	E	+	+	-	+	-	-	+ A	+	$\gamma$	-	Fracamente	5	3	4
30	Leite	D	+	+	+	+	-	-	+ A	+	$\gamma$	-	Fracamente	1	6	1
31	Queijo	B	+	-	+	+	-	-	- A	+	$\beta$	-	Fracamente	5	4	4
32	Pingo	E	+	-	+	+	-	-	+ A	+	$\gamma$	-	Fracamente	6	2	2
33	Queijo	E	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	5	3	6
34	Queijo	G	+	+	-	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Fracamente	3	8	2
35	Queijo	H	+	+	+	-	-	-	-	-	$\gamma$	-	Fracamente	3	8	2
36	Leite	G	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	9	16	1
37	Queijo	G	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Moderadamente	9	16	4
38	Queijo	F	+	+	-	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	1	6	4
39	Queijo	I	+	+	+	-	-	-	-	-	$\alpha$	-	Fracamente	3	8	2
40	Queijo	F	+	+	-	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	16		7
41	Queijo	I	+	+	-	+	-	-	+ A	-	$\gamma$	-	Não aderente	2	8	2
42	Leite	G	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Moderadamente	9	16	1
43	Manipulador	H	+	+	-	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	5	5	1
44	Manipulador	H	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	5	5	2
45	Manipulador	D	+	+	-	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	18	11	2
46	Manipulador	H	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\beta$	-	Moderadamente	5	5	4
47	Manipulador	H	+	+	+	-	-	-	-	+	$\alpha$	-	Fracamente	5	5	1
48	Manipulador	G	+	+	-	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	7	1	4
49	Manipulador	A	+	+	-	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	13	13	4
50	Manipulador	A	+	-	-	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	13	13	4

51	Manipulador	B	+	+	-	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	8	1	4
52	Manipulador	C	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	13	13	5
53	Manipulador	C	+	+	-	-	-	+	+ TSST	+	$\gamma$	+ TSST	Fracamente	13	13	4
54	Manipulador	C	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\gamma$	-	Fracamente	4	7	4
55	Queijo	C	+	+	+	-	-	-	-	-	$\gamma$	-	Não aderente	19	10	4
56	Queijo	B	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	19	10	2
57	Queijo	C	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	19	10	1
58	Queijo	F	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	4	6	12
59	Queijo	D	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Moderadamente	4	6	1
60	Queijo	E	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	10	15	9
61	Queijo	E	+	+	-	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	11	15	8
62	Queijo	H	+	+	-	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	19	9	2
63	Queijo	H	+	+	+	-	-	-	-	-	$\gamma$	-	Não aderente	19	9	6
64	Queijo	A	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	3	8	4
65	Queijo	A	+	+	+	-	-	-	-	-	$\gamma$	-	Não aderente	2	8	1
66	Queijo	A	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Fracamente	2	8	1
67	Leite	B	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	19	10	1
68	Queijo	A	+	+	+	-	-	-	-	-	$\alpha$	-	Não aderente	3	8	12
69	Leite	B	+	+	+	-	-	+	+ TSST	+	$\alpha$	-	Fracamente	19	10	10
70	Leite	A	+	+	+	-	-	-	-	-	$\alpha$	-	Não aderente	2	8	1
71	Queijo	A	+	+	-	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Fracamente	4	8	2
72	Queijo	A	+	+	-	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	3	8	4
73	Leite	A	+	+	+	-	-	-	-	-	$\beta$	-	Não aderente	2	8	2
74	Queijo	B	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	8	1	1
75	Queijo	B	+	+	+	-	-	-	-	+	$\gamma$	-	Fracamente	8	1	1
76	Leite	A	+	+	+	-	-	-	-	+	$\beta$	-	Fracamente	4	8	2

Legenda: +: reação positiva no teste; -: reação negativa no teste

**ANEXO 2. Perfil de resistência a antimicrobianos e perfil de *clusters* das amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil**

Amostra	Origem	Fazenda	Antimicrobianos				Cluster		
			Oxacilina	Eritromicina	Penicilina G	Tetraciclina	GTG <sub>5</sub>	<i>spa</i>	MALDI TOF MS 250
1	Pingo	G	S	S	R	S	12	14	2
2	Queijo	E	S	S	R	S	19	10	3
3	Queijo	D	S	S	S	S	14	12	4
4	Queijo	D	S	S	S	S	15	12	6
5	Queijo	G	S	S	R	S	3	8	4
6	Queijo	I	S	S	R	R	6	2	2
7	Leite	I	S	S	R	R	6	2	2
8	Leite	I	S	S	R	R	6	2	2
9	Queijo	E	S	S	S	S	9	16	2
10	Queijo	G	S	S	R	S	2	8	1
11	Leite	I	S	S	R	S	2	8	1
12	Pingo	E	S	S	R	S	2	8	1
13	Queijo	F	S	S	R	R	6	2	4
14	Queijo	H	S	S	R	R	6	2	11
15	Pingo	H	S	S	R	S	3	8	2
16	Pingo	I	S	S	R	R	6	2	2
17	Leite	E	S	S	S	S	19	10	2
18	Queijo	E	S	S	S	S	19	10	2
19	Queijo	I	S	S	R	S	3	8	4
20	Leite	I	S	S	R	S	1	8	1
21	Manipulador	D	S	I	S	S	17	11	2
22	Manipulador	E	S	I	S	S	17	11	2

23	Manipulador	D	S	I	S	S	18	11	2
24	Queijo	E	S	R	R	S	5	3	2
25	Queijo	B	S	S	S	S	1	4	4
26	Queijo	E	S	R	R	S	5	3	2
27	Leite	B	S	S	R	S	7	1	2
28	Queijo	B	S	S	S	S	16		2
29	Queijo	E	S	R	R	S	5	3	4
30	Leite	D	S	S	S	S	1	6	1
31	Queijo	B	I	S	R	S	5	4	4
32	Pingo	E	S	S	R	S	6	2	2
33	Queijo	E	S	R	R	S	5	3	6
34	Queijo	G	S	S	R	R	3	8	2
35	Queijo	H	S	S	R	S	3	8	2
36	Leite	G	S	S	S	S	9	16	1
37	Queijo	G	S	S	S	S	9	16	4
38	Queijo	F	S	S	S	S	1	6	4
39	Queijo	I	S	S	R	S	3	8	2
40	Queijo	F	S	S	S	S	16		7
41	Queijo	I	S	S	R	S	2	8	2
42	Leite	G	S	S	S	S	9	16	1
43	Manipulador	H	S	S	R	R	5	5	1
44	Manipulador	H	S	S	S	S	5	5	2
45	Manipulador	D	S	I	S	S	18	11	2
46	Manipulador	H	S	S	R	R	5	5	4
47	Manipulador	H	S	S	S	S	5	5	1
48	Manipulador	G	S	S	R	R	7	1	4
49	Manipulador	A	S	S	R	S	13	13	4
50	Manipulador	A	S	S	R	S	13	13	4

51	Manipulador	B	S	S	R	R	8	1	4
52	Manipulador	C	S	S	R	S	13	13	5
53	Manipulador	C	S	S	R	S	13	13	4
54	Manipulador	C	S	S	S	S	4	7	4
55	Queijo	C	S	S	R	S	19	10	4
56	Queijo	B	S	S	R	S	19	10	2
57	Queijo	C	S	S	R	S	19	10	1
58	Queijo	F	S	S	S	S	4	6	12
59	Queijo	D	S	S	S	S	4	6	1
60	Queijo	E	S	S	S	S	10	15	9
61	Queijo	E	S	S	S	S	11	15	8
62	Queijo	H	S	S	R	S	19	9	2
63	Queijo	H	S	S	R	S	19	9	6
64	Queijo	A	S	S	R	R	3	8	4
65	Queijo	A	S	S	R	S	2	8	1
66	Queijo	A	S	S	R	R	2	8	1
67	Leite	B	S	I	S	S	19	10	1
68	Queijo	A	S	S	R	R	3	8	12
69	Leite	B	S	S	S	S	19	10	10
70	Leite	A	S	S	R	R	2	8	1
71	Queijo	A	S	S	R	R	4	8	2
72	Queijo	A	S	S	R	R	3	8	4
73	Leite	A	S	S	R	R	2	8	2
74	Queijo	B	S	S	R	R	8	1	1
75	Queijo	B	S	S	R	R	8	1	1
76	Leite	A	S	S	R	R	4	8	2

Legenda: S=Sensível; I= Intermediário; R= Resistente