

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

**Viabilidade de *Staphylococcus aureus* (FRI361 e N315) e
modulação da expressão de suas toxinas (SEC e TSST-1)
em queijo tipo frescal adicionado de *Lactobacillus*
ramnosus (D1) e *Weissella paramesenteroides*
(GIR1604*)**

Gabriela Oliveira e Silva

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária da UFMG
2018**

Gabriela Oliveira e Silva

Viabilidade de *Staphylococcus aureus* (FRI361 e N315) e modulação da expressão de suas toxinas (SEC e TSST-1) em queijo tipo frescal adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* (D1) e *Weissella paramesenteroides* (GIR1604*)

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: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira e Álvaro Cantini Nunes

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária da UFMG
2018**

S586v Silva, Gabriela Oliveira e, 1984-
Viabilidade de *Staphylococcus aureus* (FRI361 e N315) e modulação da expressão de suas toxinas (SEC e TSST-1) em queijo tipo frescal adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* (D1) e *Weissella paramesenteroides* (GIR1604*) / Gabriela Oliveira e Silva. – 2018.
66 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadores: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Álvaro Cantini Nunes
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Queijo – Análise – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses.
3. Enterotoxinas – Teses. 4. Estafilococos – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de.
II. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. III. Nunes, Álvaro Cantini. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELA OLIVEIRA E SILVA

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 29 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente - Orientador


Prof. Leonardo Borges Acurcio
Centro Universitário de Formiga- UNIFOR


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


Prof. Claudia Freire de Andrade Moraes Penna
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Jacques Robert Nicoli
Instituto de Ciências Biológicas- ICB-UFMG

DEDICATÓRIA

Dedico à Bia, Tom, Pepê, Bel, Thi, Lipe, Luc e Vi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter sido a luz que me guiou esse tempo todo, pelas oportunidades de aprendizado que sempre colocou no meu caminho e por ter me fortalecido nos momentos desafiadores.

Aos meus pais, Jaime e Dativa, meus maiores exemplos de amor. Eu agradeço profundamente pela formação do meu caráter, pelo apoio incondicional em cada passo que eu dei até hoje e pela compreensão nos momentos de ausência.

Às minhas queridas irmãs, Roberta e Fabiana, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, com todo amor e paciência do mundo. É inspirador ter duas mulheres tão fortes como irmãs, amigas, conselheiras e cúmplices de caminhada.

Ao meu orientador prof Marcelo Resende de Souza, por ter me acolhido em sua equipe, pela confiança depositada e pela oportunidade de trabalho. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, não só no âmbito acadêmico, pelas longas conversas, pela disponibilidade e presteza de sempre.

À minha co-orientadora profa Mônica Pinho Cerqueira pelo carinho, disponibilidade, conselhos e pelo exemplo de profissional que tanto me inspira.

Ao meu co-orientador prof Álvaro Cantini Nunes, pelo apoio, disponibilidade e valiosos ensinamentos.

À profa Claudia Pena pelo carinho, disponibilidade, conversas e aprendizado no âmbito profissional e pessoal.

Aos demais prof do DTIPOA e funcionários, em especial a Maura, Miltinho, Marco Antônio e Cesar, pelo auxílio prestado nas análises.

Ao Dr. Luiz Simeão do Carmo, por ter concedido as amostras enteropatogênicas de *S. aureus* e pelas valiosas contribuições na construção do projeto. À Marjory Xavier por me ceder uma amostra de *S. aureus* N315.

À banca examinadora pelas críticas e sugestões.

Aos amigos de laboratório Renata, Letícia, Cosme, Giva, Felipe, Lívia, Naiara, Ranier, Gilson e Morgana, pela convivência e por tornarem viável a execução desse trabalho. Sem vocês nada disso seria possível!

Agradeço especialmente aos amigos Renata, Letícia, Cosme e Felipe que foram muito mais que colegas de trabalho, foram amigos, conselheiros, meus braços direito e esquerdo, uma verdadeira família. Eu não tenho palavras para agradecer o apoio, carinho, cuidado e a dedicação de vocês comigo e com o projeto!

Aos amigos Giva, Danilo, Talita, Rafa, Bela e Ethiene pela presença e carinho durante esse percurso, pelos momentos de descontração e amizade que foram tão importantes na sustentação desse trabalho.

Aos amigos queridos Breno Curty e Fernanda Alves pelo carinho, acolhimento, ensinamentos e amizade! Obrigada por acreditarem e apostarem em mim, quando muitas vezes eu mesma duvidava.

Aos amigos Sávio Sandes, Leonardo Acurcio, Raphael Steinberg e Silvinha Pietra por me receberem tão bem no LGMPP e pelos valiosos ensinamentos na área de biologia molecular. Especialmente ao Sávio, pela dedicação e empenho em me auxiliar, e direcionamento na realização desse projeto.

Às amigas amadas, Thaís, Samara e Karinne que estiveram sempre ao meu lado, compartilhando as alegrias e tristezas, me apoiando em todos os momentos.

À Escola Dinâmica Energética do Psiquismo (DEP) por me proporcionar um aprendizado imensurável na esfera da vida e por me auxiliar a sustentar a energia que me move. Agradeço ainda aos amigos que lá fiz, Marcilene, Fathima, Margot, Fernando, Mário, Anelise, Evandro, dentre outros. Especialmente à Marcilene, pelo apoio, amizade, carinho, companheirismo e presença em diversos momentos desse percurso.

À Jeanne Mara Vaz de Oliveira e Aida Pustilnik que me auxiliaram no processo de tomada de consciência e de apropriação do meu Ser, minha eterna gratidão.

À FAPEMIG e CNPQ pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1.	Doenças Transmitidas por Alimentos	15
3.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> e intoxicação estafilocócica	17
3.3.	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	20
3.3.1.	Capacidade de aderência e invasão	20
3.3.2.	Resistência a antimicrobianos	21
3.3.3.	Produção de substâncias que afetam o sistema imunológico	22
3.3.3.1.	Proteína A e polissacarídeos	22
3.3.1.2.	Enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1	22
3.4.	Métodos de detecção de enterotoxinas	24
3.4.1.	<i>Western Blot</i>	25
3.4.2.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
3.5.	Bactérias ácido-láticas	28
3.5.1.	Mecanismos de inibição promovidos por BAL	29
3.5.1.1.	Peróxido de Hidrogênio e Dióxido de Carbono	29
3.5.1.2.	Diacetil	30
3.5.1.3.	Ácidos orgânicos	30
3.5.1.4.	Bacteriocinas	31
3.5.1.4.1.	Conceitos e propriedades químicas	31
3.5.1.4.2.	Produção de bacteriocinas	32
3.5.1.4.3.	Mecanismos de ação de bacteriocinas	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1.	Amostras de bactérias utilizadas	35
4.2.	Curva de crescimento	35
4.3	Antagonismo <i>in vitro</i>	35
4.4	Simulação de ambiente ácido em queijo	37
4.5.	Elaboração dos queijos	38
4.6.	Análises físico-químicas e microbiológicas	40
4.7.	Análises moleculares	40
4.7.1.	Extração de RNA e qPCR	40
4.8.	Delineamento experimental	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	Curva de crescimento	43
5.2	Antagonismo <i>in vitro</i>	43
5.3	Simulação de ambiente ácido em queijo	43
5.4.	Análises físico químicas	44
5.5.	Contagens de micro-organismos	45
5.6.	Expressão gênicas das toxinas	48
6.	CONCLUSÃO	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Combinação dos inóculos de <i>S. aureus</i> e bactérias ácido-láticas utilizados na elaboração dos queijos	37
Tabela 2-	Primers utilizados nas reações de qPCR para identificação da expressão das toxinas	40
Tabela 3-	Primers utilizados na reação de PCR para a identificação de genes específicos para <i>S. aureus</i>	41
Tabela 4-	Médias de acidez titulável (% de ácido láctico) em queijos elaborados com BAL e <i>S. aureus</i> , estocados à 7°C por 01, 07 e 14	44
Tabela 5-	Médias de pH em queijos elaborados com BAL e <i>S. aureus</i> , estocados à 7°C por 01, 07 e 14 dias	44
Tabela 6-	Médias de contagens de <i>S. aureus</i> e BAL nos inóculos utilizados na produção dos queijos, em log (UFC/ml)	45
Tabela 7-	Médias de contagens de <i>S. aureus</i> e BAL nos soros coletados de cada tratamento durante a produção dos queijos, em log (UFC/mL)	45
Tabela 8-	Médias das contagens <i>L. rhamnosus</i> e <i>W. paramesenteroides</i> (log UFC/g) em queijos elaborados com BAL e <i>S. aureus</i> , nos tempos 01, 07 e 14 dias e estocagem à 7°C	47
Tabela 9-	Médias das contagens de <i>S. aureus</i> (FRI361 e N315) (log UFC/g) em queijos elaborados com BAL e <i>S. aureus</i> , nos tempos 01, 07 e 14 dias e estocagem à 7°C	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Curva de amplificação da qPCR	27
Figura 2-	Mecanismo de regulação da biossíntese de bacteriocinas	33
Figura 3-	Fluxograma de elaboração dos queijos	38
Figura 4-	Curva de crescimento realizada dos inóculos utilizados na produção dos queijos, em log UFC/mL	42
Figura 5-	Antagonismo in vitro entre BAL produtoras e <i>S. aureus</i> reveladoras expresso pela medida do halo de inibição	43
Figura 6-	Crescimento de <i>S. aureus</i> em presença de ácido láctico (0,1%, 0,2% e 0,3%), em log UFC/mL	43
Figura 7-	Nível de expressão da toxina TSST-1, pela cepa N315, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com <i>S. aureus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>W. paramesenteroides</i> , e estocados à 7°C	49
Figura 8-	Nível de expressão de toxina SEC, pela amostra N315, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com <i>S. aureus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>W. paramesenteroides</i> , e estocados à 7°C	50
Figura 9-	Nível de expressão SEC, pela amostra FRI361, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com <i>S. aureus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>W. paramesenteroides</i> , e estocados à 7°C	51
Figura 10 -	Nível de expressão de toxina TSST-1, pela cepa N315, em queijos não adicionados de micro-organismos (01) e em queijos adicionados apenas de <i>S. aureus</i> N315, ao longo de 14 dias de estocagem	53
Figura 11 -	Nível de expressão de toxina SEC, pela cepa FRI361, em queijos não adicionados de micro-organismos (01) e em queijos adicionados apenas de <i>S. aureus</i> FRI361, ao longo de 14 dias de estocagem	54

RESUMO

Os padrões microbiológicos dos alimentos são indicativos da qualidade e segurança sanitária desses produtos que podem causar danos à saúde do consumidor quando fora dos parâmetros adequados. *Staphylococcus* spp. estão fortemente associados às doenças transmitidas por alimentos por causarem intoxicação, por ação de suas enterotoxinas termoestáveis. O leite e seus derivados são um dos principais alimentos relacionados à intoxicação estafilocócica pelo fato de *Staphylococcus* spp. serem um dos principais causadores de mastite bovina. Diante disso, se faz necessário pesquisar alternativas capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus* spp. em produtos lácteos, bem como a produção de suas enterotoxinas. As bactérias ácido lácticas (BAL), componentes da microbiota natural do leite cru, são conhecidas por apresentar potencial antimicrobiano diante de diversos micro-organismos patogênicos, inclusive *Staphylococcus aureus*. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo produzir 81 queijos em laboratório, sob condições de esterilidade, adicionados de combinações entre *S. aureus*, produtores de SEC (FRI361) e TSST-1 (N315) e *Lactobacillus rhamnosus* (D1) isolada de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e *Weissella paramesenteroides* (GIR16L4*), isolada de leite cru, e estudar a viabilidade de *S. aureus* e a sua capacidade produtora de toxinas na presença de BAL. Os queijos foram armazenados a 7°C e estocados por 14 dias. O delineamento experimental foi elaborado segundo esquema fatorial 9x3, sendo nove combinações de micro-organismos e três tempos de estocagem dos queijos, em três repetições. As análises microbiológicas (contagem de *S. aureus* e BAL), físico-químicas (umidade pelo método gravimétrico, compostos nitrogenados pelo método de Kjeldahl, acidez titulável e pH) e moleculares (expressão dos genes das toxinas SEC e TSST-1 por qPCR) foram realizadas em três períodos de tempo (1, 7 e 14 dias). Ao longo dos 14 dias, observou-se que a presença de BAL não alterou o crescimento de *S. aureus*. Entretanto, foi detectada, por qPCR, uma diminuição na expressão das toxinas avaliadas, sugerindo que as BAL utilizadas podem inibir a expressão de toxinas produzidas por *S. aureus* em queijos. A modulação da expressão de *sec* e *tsst-1* por N315 ocorreu desde o primeiro dia de análise, já a expressão de *sec* por FRI361 reduziu a partir do sétimo dia de análise, sugerindo uma modulação cepa-dependente. Esses resultados nos levam a crer numa interação entre as BAL e *S. aureus* presentes na microbiota endógena do leite, capaz de inibir a expressão de toxinas estafilocócicas, reduzindo assim, a possibilidade de um indivíduo desenvolver o quadro de intoxicação estafilocócica.

Palavras chave: *S. aureus*, bactéria ácido láctica, antagonismo em queijo, enterotoxinas estafilocócicas, qPCR

ABSTRACT

Microbiological food standards are indicative of health quality and safety. Products that can cause harm to the consumer's health when they are applied. *Staphylococcus* spp. are strongly associated with foodstuffs transmitted through intoxication, caused by the action of their thermostable enterotoxins. Milk and its derivatives are one of the main foods related to staphylococcal intoxication due to the fact that *Staphylococcus* spp. are one of the main causes of bovine mastitis. Therefore, it is necessary to investigate alternatives capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus* spp. in dairy products, as well as a production of its enterotoxins. Like lactic acid bacteria (BAL), components of the natural microbiota of raw milk, they are known to present antimicrobial potential against several pathogenic microorganisms, including *Staphylococcus aureus*. Thus, the present work had the objective of producing 81 cheeses in the laboratory under sterile conditions, adding combinations of *S. aureus*, producers of SEC (FRI361) and TSST-1 (N315) and *Lactobacillus rhamnosus* (D1) isolated from cheese Serra da Canastra and *Weissella paramesenteroides* (GIR16L4 *), isolated from raw milk, and to study the viability of *S. aureus* and its toxin-producing capacity in the presence of BAL. The cheeses were stored at 7 ° C and stored for 14 days. The experiment was delimited in a factorial scheme according to a 9x3 factorial scheme, with nine combinations of microorganisms and three storage times of the cheeses in three replicates. The experimental design was elaborated according to the factorial scheme 9x3, being nine combinations of microorganisms and three times of storage of the cheeses, in three replicates. Microbiological analyzes (counting of *S. aureus* and BAL), physical-chemical (moisture by the gravimetric method, nitrogen compounds by the Kjeldahl method, titratable acidity and pH) and molecules (qPCR) were performed in three time periods (1, 7 and 14 days). Over the 14 days it was observed that the presence of BAL did not alter the growth of *S. aureus*. However, BAL is able to include an expression of toxins produced by *S. aureus* in cheeses. A modulation of the expression of secte and tsst-1 by N315 from the first day of analysis, an expression of FRI361 seg reduced from the analysis period, suggesting a strain-dependent modulation. These results are a company specialized in microbiota, capable of inhibiting an expression of staphylococcal and reduced toxins, as well as a possibility of an individual developed in staphylococcal intoxication.

Key words: *S. aureus*, lactic acid bacteria, lactic antagonism in cheese, staphylococcal enterotoxins, qPCR

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas um grande problema para a saúde pública. Os alimentos são susceptíveis a contaminações provocadas por diferentes agentes etiológicos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças por ação dos próprios micro-organismos ou de suas toxinas (Stamford *et al.*, 2006). Em alguns casos, as intoxicações alimentares ocorrem em forma de surtos alimentares, ou seja, são caracterizadas por dois ou mais casos de uma doença, com mesmo quadro clínico, resultante da ingestão de um alimento em comum.

Nos Estados Unidos (EUA), mais de nove milhões de pessoas são acometidas por DTA a cada ano (Painter *et al.*, 2013). Entre os micro-organismos de interesse em alimentos, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes àqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal (Franco e Landgraf, 2004). As doenças alimentares podem ocorrer de três formas: pela ingestão do alimento contaminado pela toxina pré-formada no mesmo, o que caracteriza a intoxicação alimentar (exemplo: *Bacillus cereus* – toxina emética; *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*); pela ingestão do alimento contaminado pelo patógeno que irá produzir a toxina no intestino, caracterizando dessa forma a toxinfecção alimentar (exemplo: *B. cereus* – toxina diarréica; *Campylobacter jejuni*; *Clostridium perfringens*; *E. coli* enterohemorrágica e enterotoxigênica e *Vibrio cholerae*); ou ainda, pela ingestão do alimento contaminado pelo patógeno que invade os tecidos causando a doença, conhecido como infecção alimentar (exemplo: *E. coli* enteroinvasiva; *Salmonella* spp.; *Shigella* spp. e *Listeria monocytogenes*) (Jay, 2005).

Dentre os agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, destaca-se *Staphylococcus aureus* (Le Loir *et al.*, 2003; Stamford *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2010). Esse micro-organismo é também um dos principais agentes da mastite bovina, contaminando o leite na sua obtenção. Os estafilococos são frequentemente associados a casos de intoxicação alimentar em todo o mundo devido à habilidade de algumas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (Jay, 2005; Charlier *et al.*, 2009). Diante desse panorama, medidas devem ser tomadas visando a redução da contaminação dos alimentos por estafilococos e sua consequente produção de enterotoxinas. Estudos na área demonstram a eficácia de bactérias ácido-lácticas (BAL), e substâncias produzidas por elas, como agentes antimicrobianos. A principal característica das BAL é a habilidade em fermentar açúcares a ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico) e acidificar o meio reduzindo o pH abaixo de 3,5, tornando o meio desafiador para a sobrevivência de outros micro-organismos, incluindo *S. aureus* (Ross *et al.*, 2000; Dabiza e El-Deib, 2007; Le Marc *et al.*, 2009; Al-Delaimy e Hamamdeh, 2013; Hor e Liong, 2014).

Diante desse panorama surgem questionamentos como: por que as pessoas comem queijos contaminados e não desenvolvem intoxicação estafilocócica? Será possível inibir o desenvolvimento de *S. aureus* e produção de suas toxinas? Sendo assim, o presente trabalho torna-se uma ferramenta importante de estudo sobre o an antagonismo entre *S. aureus* e BAL em queijos, e seus desdobramentos na expressão de toxinas estafilocócicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se a presença de *Lactobacillus rhamnosus* (D1) e *Weisella paramesenteroides* (GIR16L*) afetam a viabilidade de *Staphylococcus aureus* em queijos frescos, elaborados experimentalmente, bem como a expressão de toxinas estafilocócicas SEC e TSST-1.

2.2 Objetivos específicos

Enumerar as bactérias lácticas (BAL) e *S. aureus* utilizados nos queijos frescos produzidos em laboratório, durante 14 dias de estocagem refrigerada a 7°C.

Verificar se ocorre antagonismo entre as culturas de BAL e o *S. aureus* inoculados em queijos frescos estocados sob refrigeração.

Avaliar molecularmente a expressão das toxinas estafilocócicas SEC e TSST-1 na presença das BAL utilizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças transmitidas por alimentos

A produção mundial de alimentos é desafiadora, não só pela preocupação em aumentar a oferta, mas também em produzir alimentos nutricionalmente balanceados e de boa qualidade microbiológica e físico-química. Os consumidores estão atentos, não só com as características nutricionais dos alimentos, mas principalmente com os aspectos sanitários.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são resultantes da ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos e/ou seus metabólitos que podem causar desde gastroenterites até comprometimento sistêmico, como insuficiência renal, podendo levar à morte. Essa contaminação pode ocorrer em qualquer etapa de processamento do alimento, desde a obtenção da matéria prima até o consumo do produto final. Os agentes etiológicos envolvidos podem ser bactérias, vírus, parasitas, micotoxinas, príons, além de agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (Brasil, 2016).

As DTA podem ser de três tipos: infecção alimentar, intoxicação alimentar e toxinfecção alimentar. As infecções alimentares ocorrem quando há multiplicação e invasão celular do micro-organismo no trato intestinal do indivíduo que ingeriu o alimento contaminado. Os principais agentes etiológicos associados são: *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* e *E. coli* enteroinvasiva. A sintomatologia clínica mais comum dessas doenças é a gastroenterite, podendo ocorrer anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, geralmente acompanhado de febre. Já a intoxicação alimentar ocorre com a ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos capazes de produzir toxinas que vão espoujar o trato gastrointestinal do hospedeiro, causando quadros de dor abdominal, vômitos e /ou diarreia e náusea, geralmente não acompanhados de febre. Os principais causadores são: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (forma emética) e *Clostridium botulinum* (Forsythe, 2013). As toxinfecções são caracterizadas pela ingestão do alimento contaminado pelo micro-organismo que vai produzir a toxina causadora da doença no intestino do hospedeiro. Os sintomas associados às toxinfecções são: náuseas, dores abdominais, diarreia, vômito e geralmente ausência de febre. Os micro-organismos mais associados são: *Bacillus cereus* (forma diarréica), *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enterhemorrágica e *Vibrio cholerae*. Nos três tipos de doença alimentar, outros órgãos e sistemas também podem ser afetados, como rins, fígado, sistema nervoso central, sistema imune, dentre outros. O desenvolvimento do quadro clínico depende do agente etiológico envolvido e da resposta do sistema imune do paciente, podendo variar desde um leve desconforto intestinal até quadros de desidratação grave, diarreia sanguinolenta e insuficiência renal aguda (Jay, 2005).

Os casos de DTA podem ocorrer de forma isolada, ou em forma de surtos, que se caracterizam por episódios em que duas pessoas ou mais apresentam sinais/sintomas iguais após ingerirem alimentos e/ou água da mesma origem (Brasil, 2017). A OMS estima que mais de um terço da população mundial adoeça, anualmente, devido a surtos de DTA, mas apenas uma pequena parcela é notificada. Como os sintomas de doenças

alimentares, em geral, são brandos e duram poucos dias, a maioria das pessoas não procura auxílio médico. Entretanto, o risco é maior para pacientes imunodeprimidos, crianças e idosos, que não possuem um sistema imunológico fortalecido o suficiente para combater uma infecção branda.

Nos países desenvolvidos, as doenças de origem alimentar são responsáveis por mais de 70% dos casos de diarreia em crianças abaixo dos cinco anos (Forsythe, 2013). Entre 1998 e 2008 foram reportados nos EUA 1229 casos de surtos alimentares, causados principalmente por *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (Bennett *et al.*, 2013). Entre 1998 e 2015, ocorreram 19.119 surtos, contabilizando 373.531 doenças registradas, 14.681 hospitalizações e 337 mortes. Entretanto, esse número pode ser muito maior, uma vez que nem todos os casos ocorrem em surtos e são notificados, calculando-se cerca de 9,4 milhões de pessoas doentes, anualmente (CDC, 2017). Em 2014, os principais patógenos associados a surtos e doenças alimentares foram: *Salmonella* spp., *S. aureus* e *Campylobacter* spp. (na ordem decrescente de incidência) (CDC, 2017). Segundo Allos *et al.* (2004), nos EUA gastam-se anualmente cerca de 6,9 bilhões de dólares em tratamentos de DTA.

No Brasil, o início da vigilância de surtos de DTA se deu em 1999 e são considerados um evento de Saúde Pública, devendo receber notificação compulsória imediata, segundo Portaria nº204, de 17 de fevereiro de 2016 (Brasil, 2016). No período de 2007 a 2016 foram notificados 6.848 casos de surtos, 121.283 doentes, 17.571 hospitalizações e 111 óbitos. Em 2017, até o presente momento, 133 surtos e 2014 doentes foram notificados (Brasil, 2017). Segundo os dados da Secretaria de Vigilância Sanitária (Brasil, 2016), a região brasileira mais notificada em surtos é o Sudeste, responsável por 43,6% dos casos, seguida por Sul (24,6%), Nordeste (19,8%), Norte (7,1%) e Centro-Oeste (6,2%). Dentre os locais envolvidos em surtos, as residências estão em primeiro lugar (38,8%), seguidas por restaurante/padarias (16,1%), e demais, como eventos, escolas, hospitais e etc. Entre os alimentos associados, 66,9% não são identificados, seguidos por alimentos mistos (8,9%), água (6,1%), ovos e derivados (3,5%), leite e derivados (2,7%), doces e sobremesas (2,1%), cereais e farináceos (1,7%), carne suína (1,5%), carne de ave (1,4%), pescados e frutos do mar (0,8%), hortaliças (0,8%), bebidas não alcoólicas e frutas (0,6%), especiarias e molhos (0,3%), gelados comestíveis (0,1%). Os principais organismos envolvidos são *E. coli*, *Salmonella* spp e *S. aureus*, em ordem decrescente de ocorrência.

No Japão, 29 trabalhadores adoeceram, e oito foram hospitalizados, após ingerirem alimentação preparada pela cafeteria da companhia. Os sintomas foram clássicos de intoxicação estafilocócica, e após realização de análises foram identificadas 20 a 40 ng de SEA e contagem de $3,0 \times 10^9$ UFC/g de *S. aureus*, em amostras de ovos mexidos (Miwa *et al.*, 2001). Carmo *et al.* (2002) relataram dois surtos que ocorreram em Minas Gerais, atingindo 378 pessoas, após ingerirem queijo Minas e leite cru. Nas amostras de alimentos analisadas foram encontradas altas contagens de *S. aureus* (2×10^8 UFC/g) e enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED. Carmo *et al.* (2004) notificaram um surto que ocorreu no verão de 1998 em Minas Gerais, após uma cerimônia religiosa, atingindo 4000 pessoas, sendo que 2000 foram hospitalizadas por apresentarem vômito, náusea e diarreia. Amostras dos

alimentos envolvidos (arroz, feijão, frango e carne) e *swab* de mão dos manipuladores foram analisadas, sendo encontrada enterotoxina SEA e amostras de *Staphylococcus* contendo genes codificadores de produção de SEA, SEB e SEG.

Ikeda *et al.* (2005) relataram um surto que ocorreu em Osaka, Japão, em 2000. Após a ingestão de leite reconstituído, mais de 10.000 pessoas apresentaram sintomas de intoxicação estafilocócica. Autoridades locais chegaram a conclusão de que a causa da intoxicação foi a presença de enterotoxinas SEA e SEH, depois de análises imunológicas e moleculares. Segundo Jørgensen *et al.* (2005), oito pessoas desenvolveram intoxicação estafilocócica, no Japão, após ingerirem purê de batata preparado com leite cru. Amostras do purê e do leite do tanque foram analisadas, identificando-se gene *seh*, por PCR e a enterotoxina SEH, por ELISA.

Um surto de intoxicação estafilocócica foi relatado na Índia (Nema *et al.*, 2007), envolvendo mais de 100 pessoas, entre crianças e adultos, após a ingestão de um salgadinho típico da região, feito com batata e frito em óleo vegetal. Em amostras do alimento e de vômito dos envolvidos, foi possível detectar a presença de genes *seb* e *sed*, bem como de enterotoxinas SEB e SED.

Em 2009, na França, foram notificados seis surtos de intoxicação estafilocócica, após ingestão de queijo fresco feito com leite não pasteurizado. Amostras de queijo foram analisadas, encontrando-se não só o gene *see*, como também a enterotoxina E (Ostyn *et al.*, 2010).

Na Alemanha, 13 pessoas foram acometidas por intoxicação estafilocócica, sendo sete hospitalizadas, após a ingestão de sorvete em uma cerimônia religiosa. Amostras de vômito, fezes e alimento foram analisadas, encontrando-se estafilococos coagulase positivo e SEA (Fetsch *et al.*, 2014).

A investigação de surtos, envolvendo seus agentes etiológicos e a epidemiologia da doença, é uma ferramenta importante para a adoção de medidas preventivas evitando-se novos casos. Os órgãos de vigilância epidemiológica atuam frequentemente não só na investigação, como na elaboração de protocolos que devem reger a produção e comercialização de alimentos.

3.2 *Staphylococcus aureus* e intoxicação estafilocócica

Entre os micro-organismos de interesse em alimentos, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes àqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal (Franco e Landgraf, 2004). Dentre os agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, destaca-se *Staphylococcus aureus* (Stamford *et al.*, 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos em formas de cachos de uva que se coram como Gram positivo, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5µm, anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos (Lancette e Tatini, 2001). Elas são encontradas facilmente em pêlos, pele, boca, nariz, glândulas mamárias e trato respiratório superior do homem e animais, além de ar, poeira, água e superfícies ambientais. Eles são micro-organismos mesófilos, que crescem numa faixa de temperatura entre 7 e 48°C (temperatura ótima em 37°C), crescem em atividade de água

(a_w) a partir de 0,86 a 0,99, tendo sido encontrado crescimento em condições de 0,83, sendo o único micro-organismo não-halofílico capaz de crescer em condições tão baixas de a_w . A faixa de pH para seu crescimento varia entre 4,0 e 9,8, sendo o ideal entre 6,0 e 7,0 (Jay, 2005; Hennekinne *et al.*, 2012).

S. aureus são produtores de várias enzimas como coagulase, termonuclease e hemolisina (Lancette e Tatini, 2001; Franco e Landgraf, 2004; Forsythe, 2013). Mais de 30 espécies de *Staphylococcus* spp. são descritas, podendo ser distribuídas em dois grupos, segundo sua capacidade de produzir coagulase. Dentre as espécies de estafilococos coagulase-positiva, destacam-se: *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, sendo a primeira a mais encontrada. Já os estafilococos coagulase-negativo são representados pelas espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. chromogens*, *S. xylosus*, dentre outras (Jay, 2005). Durante muito tempo acreditou-se que a capacidade de produzir coagulase estava diretamente relacionada ao potencial de produzir toxinas. Alguns estudos investigaram a presença de gene produtor de enterotoxina em amostras de *S. aureus* coagulase-negativo, mas não obtiveram sucesso (Rosec *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2001). Entretanto, pesquisas posteriores encontraram genes potencialmente produtores de enterotoxinas em amostras de estafilococos coagulase-negativo (Cunha *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2007; Zell *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2013; Podkowik *et al.*, 2013).

As espécies de *Staphylococcus* são frequentemente isoladas de uma grande variedade de alimentos como carne, queijo e leite; além de fontes como solo, areia e água (Heikens *et al.*, 2005). Segundo Jay (2005), os principais alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica são o leite, creme, queijo, carne cozida, frango, presunto, batata e saladas de batata e atum, carne e derivados, saladas e produtos de confeitaria, sendo que muitos desses itens são contaminados durante o preparo em casa ou em restaurantes e armazenados em condições inadequadas de temperatura (Lancette e Tatini, 2001). De acordo com Hennekinne *et al.* (2012), os alimentos associados às intoxicações estafilocócicas podem variar de acordo com o país, estando possivelmente relacionado aos hábitos alimentares dos mesmos. Nos EUA, por exemplo, o alimento mais envolvido com surtos de intoxicação estafilocócica é a carne e seus derivados, já na França, o alto consumo de leite não pasteurizado coloca esse alimento como o principal responsável (Le Loir *et al.*, 2003). O leite e seus derivados estão fortemente relacionados a esse tipo de intoxicação, também pelo fato de que *S. aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina, podendo contaminar o leite na sua obtenção, comprometendo a qualidade sanitária no decorrer do seu processamento.

A primeira associação de *Staphylococcus* com doenças transmitidas por alimentos ocorreu em 1884, quando o micro-organismo foi isolado em queijos envolvidos em surto alimentar (Bennett, 2005). Em 1907, foi encontrado em bifes envolvidos em um surto alimentar, no qual as pessoas apresentaram sintomatologia característica de intoxicação estafilocócica. Em 1914, leite proveniente de vacas com mastite estafilocócica causou intoxicação em pessoas que o ingeriram. Em 1930, *Staphylococcus* spp. foram isolados de amostras de pão de ló, após 11 pessoas ingerirem e apresentarem sinais de intoxicação estafilocócica. Os micro-organismos foram administrados via intravenosa em coelho e oralmente em humanos voluntários, o coelho morreu após manifestação de diarreia

aquosa, e os humanos apresentaram sintomas como náusea e vômito, após 3h de ingestão. Entretanto, foi durante a Segunda Guerra Mundial, que ocorreu o primeiro grande surto de intoxicação estafilocócica. Cerca de 2000 soldados alemães adoeceram após ingerirem salsicha contaminada por *Staphylococcus* spp. (Hennekinne *et al.*, 2012).

Segundo Hennekinne *et al.* (2012), para que um quadro de intoxicação estafilocócica se instale e se desenvolva são necessários cinco fatores: 1) uma fonte contendo estafilococos produtor de enterotoxina; 2) transferência desses estafilococos para o alimento, quando a matéria prima não é a fonte; 3) composição do alimento apresentando condições físico-químicas favoráveis ao desenvolvimento de estafilococos e produção de enterotoxinas; 4) temperatura favorável e tempo suficiente para crescimento bacteriano e toxigênese; 5) ingestão do alimento contaminado com quantidades suficientes para causar a intoxicação.

A maioria dos casos de intoxicação estafilocócica, bem como qualquer DTA, não é notificada aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que leva a uma subnotificação da doença. Por se tratar de uma moléstia de curso rápido (24-48h) e autolimitante os indivíduos acometidos, geralmente, não necessitam de atendimento médico (Borges *et al.*, 2008). O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas (Le Loir *et al.*, 2003), principalmente no intervalo de 1 a 6 horas (Jay, 2005) e completa recuperação de 1 a 3 dias, com baixa taxa de mortalidade (Su e Wong, 1997). Os principais sintomas são: náusea, câimbras abdominais (bastante agudas), diarreia, dor de cabeça, sudorese, prostração e algumas vezes, queda na temperatura corporal (Le Loir *et al.*, 2003; Jay, 2005; Santana *et al.*, 2006). A ação emética é a mais comum e, segundo Dinges *et al.*, (2000), os receptores para as enterotoxinas estão localizados nas vísceras abdominais, principalmente no intestino. Dessa forma, o estímulo é transferido pelo nervo vago ao centro do vômito ocasionando a retroperistalsia do intestino e estômago culminando em episódios de vômito. A ação diarreica é menos comum, e seu mecanismo ainda não é bem esclarecido; porém, acredita-se que esteja envolvido com inflamação e irritação da mucosa gastrointestinal (Franco e Landgraf, 2004). O tratamento usual consiste em repouso e manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, e eventual uso de analgésicos em quadros de intensas dores abdominais e de cabeça (Jay, 2005).

A quantidade de *S. aureus* necessária para o início da síntese de enterotoxinas é controversa. Segundo Adesiyun *et al.* (1998), amostras enterotoxigênicas de *S. aureus* devem atingir contagens de 10^6 UFC/g do produto para haver liberação de enterotoxina em quantidade suficiente para causar alterações à saúde do consumidor. Segundo Almeida e Franco (2003), são necessários 10^5 UFC/g de *Staphylococcus*/g para produzir quantidades de toxinas suficientes para causar intoxicação. Entretanto, Carmo *et al.* (2002) observaram produção de enterotoxinas estafilocócicas com contagens a partir de 10^3 UFC/g. Já a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar doença em humanos é aproximadamente 20ng. Este valor foi estabelecido após um surto de gastroenterite estafilocócica veiculado por leite achocolatado nos EUA (Jay, 2005).

3.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus aureus se caracteriza como um patógeno oportunista que está presente, naturalmente, em pele e mucosa sem causar danos ao hospedeiro. Quando essas barreiras fisiológicas são rompidas, ocorre a invasão do micro-organismo, podendo causar desde infecções simples até graves e, em alguns casos fatais, dentre elas: infecções cutâneas, pneumonia, endocardite, osteomielite e ainda intoxicações alimentares quando presentes em alimentos (Gorwitz *et al.*, 2006; Loveday *et al.*, 2006; Cruz, 2008). As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser ocasionadas por invasão direta dos tecidos, bacteremia primária ou, ainda, por metabólitos que ele produz. O micro-organismo primeiro se adere à pele ou mucosa, rompe as barreiras do epitélio e promove a invasão nos tecidos. Após esse processo, ele necessita de estratégias que permitam a sua sobrevivência e proliferação no organismo do hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com opsonização do complemento, neutralização da fagocitose e inibição das respostas imunes humoral e celular (Iwatsuki *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Santos, 2009).

O grau de patogenicidade e de colonização de *S. aureus* está relacionado com seus fatores de virulência, os quais têm papel fundamental na adesão celular, captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Santos *et al.*, 2007). Segundo Velázquez-Meza (2005), esses fatores de virulência podem ser classificados em três categorias: capacidade de aderência e potencial de invasão às células do hospedeiro, à matriz extracelular e à superfície de cateteres e próteses; produção de substâncias que afetam o sistema de defesa do hospedeiro; resistência à antimicrobianos.

Os estafilococos não expressam constantemente seus fatores de virulência. Isso só ocorre quando o micro-organismo se vê ameaçado pela presença de substâncias capazes de neutralizá-lo. Dessa forma, a expressão dos genes de virulência de *S. aureus*, é controlada por um sistema de regulação composto por dois operons divergentes, denominado *agr* (*accessory gene regulator*). A ativação desse sistema pode se dar pela existência de um outro mecanismo chamado *quorum-sensing*, que é caracterizado pela percepção de altas densidades populacionais do próprio micro-organismo, desencadeando ações inibitórias, como a produção de fatores de virulência (Bronner *et al.*, 2003; Almeida, 2009; Andrey, 2011; Painter *et al.*, 2014).

3.3.1 Capacidade de aderência e invasão

A capacidade de aderência e invasão de *S. aureus* se dá pela produção de moléculas como o fibrinogênio, colagenase, coagulase, hialuronidase, lipase, α toxina, β , γ e δ hemolisinas e formação de biofilmes. A coagulase transforma fibrinogênio em fibrina, formando coágulos e dificultando a fagocitose do patógeno. A hialuronidase degrada a matriz extracelular do hospedeiro, facilitando a invasão dos tecidos. Já a lipase, ao hidrolisar lipídeos garante a sobrevivência dos estafilococos em regiões sebáceas (Murray *et al.*, 1999). As exotoxinas α , β , γ e δ , são responsáveis por promover poros na membrana de células sanguíneas, ocasionando uma evasão de substâncias essenciais para as células e consequente morte celular.

A produção de biofilmes é uma habilidade complexa de sobrevivência do micro-organismo em superfícies (Santos, 2009). O biofilme consiste na aglomeração de células bacterianas envoltas por uma matriz polissacarídica, produzida pelas bactérias envolvidas nessa adesão. A formação de biofilme ocorre geralmente em duas etapas: adesão da bactéria a uma superfície, e adesão intercelular, formando múltiplas camadas bacterianas (Gotz, 2002). Um importante gene tem sido associado a formação de biofilmes por *S. aureus*. Ele é o operon *icaADBC* que codifica proteínas envolvidas na síntese do polissacarídeo de matriz poli-N-sucinil β -1,6 glucosamina (PNSG). Esse polissacarídeo está envolvido na ligação entre as células bacterianas da matriz de biofilmes (O'Neil *et al.*, 2007; Santos, 2009).

O biofilme pode contribuir para a persistência bacteriana em sítios infecciosos ou para infecções crônicas, uma vez que dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos. Além disso, a presença do biofilme em superfícies promove a liberação lenta e gradual dos micro-organismos no meio, promovendo uma contaminação do ambiente, como por exemplo, em placas de pasteurizadores em laticínios (Santos *et al.*, 2007; Santos, 2009; Martin, 2015).

3.3.2 Resistência a antimicrobianos

S. aureus é capaz de demonstrar resistência a antimicrobianos, dificultando o tratamento em casos de infecções hospitalares. A resistência aos antimicrobianos possivelmente tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias. Em vias de regra, a resistência que ocorre por mutação provoca uma alteração no sítio de ação do antimicrobiano, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente ocasiona uma inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (Tavares, 2002). O uso indiscriminado de antimicrobianos é o principal fator responsável pela seleção de micro-organismos resistentes (Guimarães *et al.*, 2012). A resistência de *S. aureus* à meticilina (MRSA) é conhecida como uma das mais prevalentes no mundo, sendo capaz de causar infecções hospitalares graves, podendo levar o indivíduo a morte. Ela é determinada por um gene cromossômico (*mecA*) do *S. aureus*, o qual codifica modificações no receptor do betalactâmico, estimulando a produção de uma proteína ligadora de penicilina (PPB2a) com baixa afinidade pelo antimicrobiano, resultando em resistência (Santos *et al.*, 2007).

Pereira *et al.*, (2009) avaliaram 148 amostras de *S. aureus* provenientes de diversos alimentos, e encontraram genes enterotoxigênicos *sea*, *seg* e *sei* em 102 amostras. Dentre as 148 amostras, 102 apresentaram resistência à ampicilina e 108 à penicilina. Schuenk (2009) avaliou 93 amostras de *S. aureus* provenientes de pacientes internados em dois hospitais do Rio de Janeiro com infecções associadas, ou não, à próteses articulares. Ele encontrou o gene *icaA* em 100% das amostras. Além disso, 55 (60%) das amostras avaliadas apresentaram resistência a eritromicina, 37(40%) a ciprofloxacina, 28 (30%) ao cloranfenicol e clindamicina, e 9 (10%) a gentamicina. A presença desse gene traz uma preocupação pela possibilidade de formação de biofilmes em hospitais, gerando uma fonte contínua de contaminação para os pacientes. Guimarães *et al.*, (2012) avaliaram a presença de genes codificadores de resistência antimicrobiana (*mecA* e *blaZ*) em 60

isolados de *S. aureus* provenientes de vacas (30) e búfalas (30) com mastite. Os autores encontraram gene *mecA* em um isolado de bubalino e três isolados de bovinos, e gene *blaZ* em seis isolados de bubalino e um isolado de bovino. Eles observaram também que isolados de vacas apresentaram menor sensibilidade a antimicrobianos no teste de disco-difusão quando comparados a isolados de búfalas. Gücükoğlu *et al.*, (2013) avaliaram a prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos e MRSA. De 35 amostras isoladas de sorvete, 13 apresentaram genes *sea*, *seb* e *sed*, e apenas uma apresentou gene *mecA*. Dabul (2014) encontrou linhagens de MRSA, isolados em hospital em Belo Horizonte, resistentes também a outros antibióticos, como por exemplo, daptomicina e tigeciclina. O que serve de alerta, pois, reduz a variedade de antibióticos que podem ser utilizados para eliminar esse micro-organismo.

3.3.3 Produção de substâncias que afetam sistema imunológico

S. aureus produz substâncias como a proteína A, polissacarídeos capsulares, enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Essas substâncias afetam o sistema imunológico do hospedeiro, que não consegue reagir adequadamente para combater o micro-organismo.

3.3.3.1 Proteína A e polissacarídeos

A proteína A é conhecida por interagir com imunoglobulinas humanas e animais e se ligar preferencialmente à porção Fc da imunoglobulina G (IgG). Ela interfere na opsonização e na fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares, ativando o complemento e estimulando reações de hipersensibilidade dos tipos imediato e tardio (Konemam *et al.*, 2001; Santos, 2009). O ácido tecóico é um polissacarídeo capaz de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citocinas. O glicanopeptídeo é um polímero de polissacarídeo que atua como agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e induz a produção de interleucina-1 que vai atuar na resposta inflamatória e imune (Oliveira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2007).

3.3.3.2 Enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1

As enterotoxinas estafilocócicas, grupo de proteínas simples com baixo peso molecular (27.000 a 34.0000 Da), são produzidas durante todas as fases do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a metade para o fim da fase exponencial. Elas são resistentes à ação de enzimas proteolíticas como a pepsina e tripsina, e relativamente estáveis ao aquecimento, resistindo aos tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização do leite (Le Loir *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2002). Elas são ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, apresentando duas cisteínas formando ponte dissulfeto. A produção de enterotoxinas sempre foi associada a amostras de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease (Jay, 2005). Entretanto, algumas cepas e/ou espécies que não produzem coagulase e/ou termonuclease podem produzir enterotoxinas.

O número de enterotoxinas tem aumentado pela detecção de novos genes. Os tipos antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas são denominados por SE agregado da letra correspondente à sua descoberta. Segundo Bergdoll (1990), as enterotoxinas mais

importantes são SEA, SEC, SEB, SED e SEE, na ordem decrescente de ocorrência. Atualmente, são descritas na literatura vinte e quatro enterotoxinas estafilocócicas (EE). Além das denominadas clássicas, SEA, SEB, SEC (1, 2 e 3), SED e SEE, foram descritos novos tipos: SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET. Há também EE que não possuem atividade emética ou que não foram testadas para tal característica, as enterotoxinas-like (SEIs), SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIV e SEIX (Argudín *et al.*, 2010; Podkowik *et al.*, 2013). Segundo Freitas (2005), as enterotoxinas são similares quanto a sua composição e atividade biológica, mas são identificadas separadamente baseadas nas diferenças antigênicas.

Além de todas estas enterotoxinas, existe uma toxina previamente denominada enterotoxina F, que é conhecidamente responsável por causar febre, hipotensão e congestão de vários órgãos, podendo levar a morte pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Forsythe, 2013). Alguns autores pesquisaram a presença de TSST-1 em alimentos concomitantemente à presença de enterotoxinas estafilocócicas e perceberam que geralmente estão associados. Johnson *et al.* (1991) encontraram genes produtores de enterotoxinas A até E e TSST-1 em amostras isoladas de alimentos.

Valle *et al.* (1991) pesquisaram 342 isolados de pele, mucosas, sangue e leite de cabras, e descobriram que 82 eram capazes de produzir a toxina TSST-1. Kenny *et al.* (1993) avaliaram 262 isolados de secreção mamária de vacas e detectaram a produção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE e toxina TSST-1, por imunodifusão. Sendo que as mais encontradas foram SED, TSST-1 e SEC, em 58, 50 e 44 isolados, respectivamente.

Mehrotra *et al.* (2000) pesquisaram a presença de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst*, *mecA*, *eta* e *etb* em 107 isolados de *swab* nasal de humanos. Dentre eles, 26 foram positivos para *tsst*, 21 para *sea*, 8 para *sec*, 6 para *seb* e 2 para *sed*, e os outros genes não foram encontrados. Sospedra *et al.* (2012) identificaram a presença de toxina TSST-1 em 1 de 53 isolados de *swab* de manipuladores de alimentos e utensílios utilizados em restaurantes. Carvalho *et al.* (2013) avaliaram, por sensibilidade ótima em placa, a produção de TSST-1, SEA, SEB, SEC e SED em 95 isolados de *S. aureus* proveniente de leite bovino (31) e alimentos envolvidos em surtos de intoxicação (64). Eles perceberam que SEB e TSST-1 foram as toxinas de maior ocorrência entre as amostras analisadas, sendo encontrados em 27 amostras de alimentos e 22 de leite.

Embora não haja registro na literatura de intoxicação estafilocócica causada por TSST-1, os trabalhos supracitados confirmam a ocorrência da toxina em alimentos, utensílios de cozinha e *swab* de manipuladores de alimentos. Ademais, Schlievert *et al.* (2000) induziram a síndrome do choque tóxico em coelhas após inoculação de TSST-1 via oral, vaginal e intravenosa, além de promoverem quadros de diarreia em macacos que receberam a toxina via oral. Diante disso, nota-se a importância de estudos avançados com o objetivo de compreender melhor a relação entre essa toxina e sua possível ação em quadros de intoxicações quando associada a enterotoxinas, ou até mesmo seu potencial em causar síndrome do choque tóxico quando ingerida oralmente.

Os fatores de virulência de *S. aureus* são de extrema importância para a sobrevivência desse micro-organismo no meio em que se encontra. Muito se têm pesquisado sobre a presença de genes relacionados a esses fatores e as variáveis que podem impedir a manifestação da virulência e patogenicidade de *S. aureus*. Os estudos têm avançado nessa área e alguns autores correlacionam o potencial antagonista de bactérias ácido láticas (BAL) frente a ação de *S. aureus*. Entretanto, há ainda muito o que se pesquisar nessa área.

3.4 Métodos de detecção de enterotoxinas

As enterotoxinas estafilocócicas, por serem proteínas simples, são difíceis de serem detectadas por métodos químicos. Portanto, os métodos biológicos, imunológicos e moleculares são os mais utilizados para a detecção (Santana *et al.*, 2010; Santiliano *et al.*, 2011). Segundo Santiliano *et al.*, (2011), os ensaios imunológicos são mais sensíveis e específicos, além disso, são a base para detecção de enterotoxinas identificadas sorologicamente. De acordo com Lancette e Tatini (2001), a maior dificuldade encontrada na identificação de enterotoxina estafilocócica em alimentos é a pequena quantidade presente no alimento envolvido no surto.

Os métodos biológicos de detecção de enterotoxinas geralmente utilizam macacos, coelhos e cobaias, que recebem aplicações intragástricas de amostras supostamente contaminadas por enterotoxinas, medindo-se a atividade emética nos animais (Santiliano, 2011). Entre as desvantagens podem ser citadas a incapacidade de diferenciar as toxinas, dificuldade de manutenção dos animais (Bergdoll e Robbins, 1973), variação na sensibilidade dos animais, desenvolvimento de resistência a repetidas administrações e alto custo dos ensaios (Santiliano *et al.*, 2011).

Dentre os métodos imunológicos incluem-se ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA), imunodifusão, sensibilidade ótima em placa (OSP) e aglutinação em látex. Os métodos de imunodifusão tradicionais, os quais são baseados na capacidade de interação da enterotoxina (antígeno) com anticorpos policlonais específicos, formando um precipitado, são testes com pouca sensibilidade, pois muitas amostras de estafilococos produzem enterotoxinas em quantidades inferiores a 1ng/mL (Teva *et al.*, 2010). Existem métodos mais sensíveis e com resultados mais rápidos para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas, que permitem níveis de detecção próximos a 0,1-1,5 ng/mL, dos quais os métodos mais conhecidos são aglutinação reversa passiva em látex (RPLA) e ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), havendo no mercado kits para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, como o SET-RPLA (Oxoid) e o VIDAS-SET2 (BioMerieux), este último por meio de Enzyme Linked Fluorescent Imunoassay (ELFA), um método semelhante ao ELISA, mas com maior sensibilidade devido à presença do substrato 4-metil-umbeliferil-fosfato que, após ser hidrolisado pela fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona e emite fluorescência captada e mensurada por um equipamento específico do mesmo fabricante (Leite *et al.*, 2005).

Os métodos moleculares compreendem a detecção das toxinas por *Western Blot* e reação em cadeia de polimerase (PCR) (Santiliano *et al.*, 2011).

3.4.1. Western blot

Esse é um método semi-quantitativo altamente específico, particularmente indicado para análise de proteínas insolúveis (Brett *et al.*, 1999). A técnica baseia-se na combinação de três métodos: proteínas são separadas por tamanho por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS), ou por ponto isoelétrico usando gel de enfoque isoelétrico; transferência das moléculas para uma membrana (geralmente de nitrocelulose), que é, então, incubada com anticorpos específicos marcados por enzimas, radionuclídeos, fluorocromos, metais coloidais ou complexo biotinina-avidina-peroxidase (Santiliano *et al.*, 2011; Teva *et al.*, 2010). Após a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida, ocorre migração das proteínas para a membrana de nitrocelulose que serve de suporte para reação imunológica (Lora, 2009). De acordo com Teva *et al.* (2010), a reação antígeno-anticorpo é concretizada pela formação de imunocomplexos com proteínas definidas e identificadas por seus pesos moleculares.

3.4.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica denominada reação em cadeia pela polimerase (PCR) é caracterizada pela amplificação de sequências específicas de DNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Mattos, 2005). Ela foi concebida em 1983 por Kary Mullis (Freitas, 2005) e, segundo Singh *et al.* (2001), além da detecção de micro-organismos, a PCR é eficiente também na detecção de genes codificadores de fatores de virulência, caracterização interespecies, estudos taxonômicos e de epidemiologia molecular. A técnica de PCR, ao tornar possível localizar um pequeno fragmento de DNA em uma complexa mistura de moléculas mais ou menos fragmentadas e replicá-lo milhões de vezes, permitindo a sua posterior identificação, tem contribuído para a identificação de espécies componentes em diferentes produtos alimentares, inclusive no leite e no queijo (Rall *et al.*, 2008).

Esse método é amplamente utilizado para detecção dos genes codificadores de enterotoxinas. Apesar de ser um teste específico, ele não é capaz de assegurar que há expressão de toxinas no material biológico (Sasaki *et al.*, 2005). A maior vantagem desse método é possuir alta sensibilidade e precisão, mesmo quando são testadas amostras com baixa concentração de micro-organismos (Santiliano *et al.*, 2011). A PCR tem sido muito utilizada em diagnósticos microbiológicos pela sua rapidez, alta seletividade, bom limite de detecção e potencial para otimização (Freitas, 2005). Contudo, o alto custo em investimentos tecnológicos, assim como a necessidade de aprovação oficial e instruções padronizadas, impede que seja utilizado em alguns casos (Malorny *et al.*, 2003). De acordo com Mattos (2005), a técnica da PCR é dividida em três fases. A fase inicial ocorre em altas temperaturas, correspondendo à desnaturação da dupla fita do DNA que se separa em duas fitas simples. Esse aquecimento geralmente ocorre a 95°C por 30 a 60 segundos (Lima, 2001). Na segunda fase, há o anelamento dos iniciadores que complementam a região da fita do DNA pesquisada (Mattos, 2005). Nessa etapa ocorre um resfriamento a cerca de 50-65°C para que ocorra a ligação dos primers às regiões complementares das fitas separadas de DNA (Souza, 2007). Segundo Mattos (2005), a

terceira fase é caracterizada basicamente pela polimerização por ação da enzima DNA polimerase (Taq DNA polimerase). De acordo com Lima (2001), a reação é levada a 72°C por um minuto para que a Taq polimerase acrescente os nucleotídeos em sequência aos primers. Esse ciclo é repetido várias vezes para a obtenção de milhões de cópias, sendo que para uma amplificação eficiente são necessários de 20 a 40 ciclos (Trindade *et al.*, 2003).

Os componentes essenciais para a realização da PCR são os primers, Taq polimerase, desoxinucleotídeos (dNTP), DNA molde, íons magnésio, solução tampão e aparelho termociclador. O volume total da reação varia de 25 a 100µL (Freitas, 2005). A enzima Taq polimerase funciona na presença de íons de Magnésio (Mg²⁺) e dos quatro dNTP, sendo que cada ciclo completo dura em torno de cinco minutos e tem como resultado o dobro da quantidade de DNA (Mattos, 2005).

O DNA extraído geralmente é quantificado em gel de agarose por meio da eletroforese, corado com brometo de etídeo e visualizado no fotodocumentador (Souza, 2007). A amostra é submetida à eletroforese para que haja separação das partículas pela corrente elétrica. A eletroforese pode ser em gel ou capilar. Se for em gel, pode ser em placa de agarose ou policrilamida. Após a eletroforese não é possível visualizar as partículas, por isso é necessário corar a banda com brometo de etídeo, nitrato de prata ou gel *red*. O brometo de etídeo é cancerígeno quando em contato prolongado com a pele; porém, é o reagente de custo mais acessível e o mais adequado para corar gel de agarose (Rodrigues, 2008). A eletroforese do gel é realizada em uma cuba preenchida por uma solução tampão para que as moléculas se separem por densidade e polaridade (Paixão, 2009). O gel é corado por difusão do brometo de etídeo e se autoconcentrando nas regiões de contato com o DNA, podendo ser visto como bandas laranjas fluorescentes quando exposto à luz ultravioleta (Carniello *et al.*, 2008). O gel é colocado no fotodocumentador, é tirada uma fotografia do mesmo e a imagem é enviada para o computador aonde será editada pelo software específico. O sequenciamento genético é dado pelo peso molecular que definirá a migração das partículas imersas no gel de agarose.

Rall *et al.* (2008) encontraram genes produtores das enterotoxinas clássicas em 39 dos 57 isolados avaliados. Silva (2013) avaliou 102 isolados de *S. aureus* para detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* e observou presença de pelo menos um desses genes em 86 isolados. Hait *et al.* (2014) avaliaram 85 isolados de *S. aureus* provenientes de *swab* de cozinha de padaria e encontraram genes produtores de enterotoxinas clássicas em 81 dos isolados.

Higuchi *et al.* (1993), desenvolveram uma técnica mais elaborada de PCR, conhecida como PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), quando adicionaram brometo de etídeo à reação e acoplaram câmeras para medir a fluorescência desse corante, que aumentava na presença de DNA de fita dupla, ou seja, a cada ciclo da reação (Morgante e Blawid, 2016). Com essa técnica é possível quantificar em tempo real o DNA amplificado em cada ciclo (Heid *et al.*, 1996).

A qPCR apresenta três fases conhecidas como crescimento exponencial, crescimento linear e estacionária. A fase de crescimento exponencial é a mais específica e precisa, sendo considerada a melhor para se estudar a reação pela elevada eficiência registrada, devido maior quantidade de material genético. Na fase de crescimento linear inicia-se o processo de degradação desse material e a fase estacionária caracteriza-se pelo alto grau de degradação dos produtos da PCR (Kubista *et al.*, 2006; Oliveira, 2010). O sinal de fluorescência gerado durante a reação é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado durante ao longo dos ciclos.

Os dados obtidos durante a reação são avaliados por um *software* e a curva de amplificação contém os dados necessários para interpretação dos resultados (Figura 1).

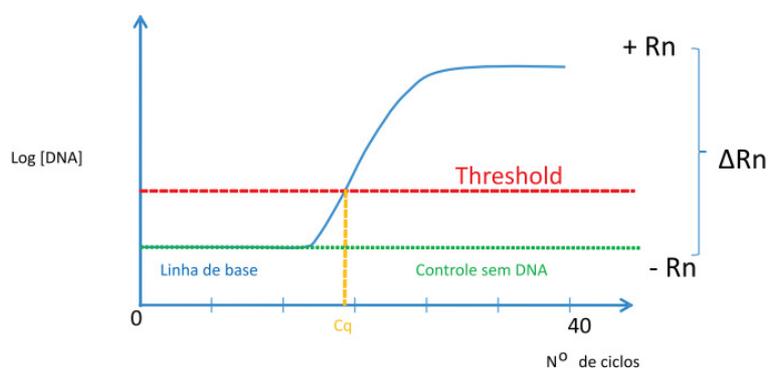


Figura 1: Curva de amplificação da qPCR. Fonte: Morgante e Blawid (2016)

A linha de base ou *baseline* refere-se à fluorescência de fundo ou ruído, sendo detectada nos primeiros ciclos da reação. Esse valor não é considerado na análise do resultado, apenas os valores acima da linha de base são avaliados como referentes à amplificação da molécula alvo. A fluorescência repórter é aquela emitida pelo fluoróforo utilizado, e a fluorescência passiva é emitida por um fluoróforo adicional, com o objetivo de corrigir flutuações no sinal de fluorescência. O valor Rn é referente à fluorescência repórter normalizada pelo corante da fluorescência passiva. É calculado pela razão entre intensidade de emissão da fluorescência repórter e da fluorescência passiva. O Rn+ corresponde ao valor da reação que contém todos os componentes, o Rn- é o valor de uma amostra não reagente e o ΔRn é o valor gerado pela diferença de Rn+ e Rn-, sendo o considerado para as quantificações. O *threshold* é o ponto que ultrapassa a fase exponencial da reação, acima da linha de base. O C_T ou *cycle threshold* corresponde ao número de ciclos necessários para detecção da fluorescência (Oliveira, 2010; Morgante e Blawid, 2016).

A qPCR tem sido amplamente utilizada para avaliar a expressão gênica e consequente identificação de micro-organismos, assim como de seus possíveis metabólitos, em alimentos (Even *et al.*, 2009; Duquenne *et al.*, 2010; Nouaille *et al.*, 2014). Para tal análise, os sistemas de detecção de fluorescência associados ao amplicon mais utilizados são o que emprega fluoróforo intercalante (SYBRTM Green), ou o método por sonda de

hidrólise (TaqMan[®]) (Morgante e Blawid, 2016). No presente trabalho essa técnica foi utilizada para detectar a expressão gênica dos genes *sec* e *tsst-I*, produtores de toxinas estafilocócicas ao longo do tempo de estocagem dos queijos, na presença de bactérias ácido lácticas.

3.5 Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) são micro-organismos que se coram como Gram positivo, não esporuladas, que se apresentam em forma de cocos ou bastonetes, são catalase negativa, fermentadoras, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos (Guedes Neto *et al.*, 2005; Herrera, 2006). Esse grupo compreende 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Essa classificação em diferentes gêneros se dá pela diferenciação da morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimentos em diferentes faixas de temperatura e concentração de sal, tolerância a bases e ácidos, além da relação filogenética entre os diferentes micro-organismos elucidada pelo sequenciamento do RNA ribossômico (Holzapfel *et al.*, 2001; Jay, 2005; Mayo *et al.*, 2008).

Esses micro-organismos estão diretamente relacionados à fermentação do leite e sua transformação em queijo. Considerando-se o metabolismo, as BAL podem ser consideradas homofermentativas, quando utilizam a via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) tendo como principal produto da fermentação o ácido lático; e heterofermentativas, quando utilizam a via 6fosfogluconato/fosfocetolase, produzindo ainda dióxido de carbono, etanol, acetato e ácidos graxos voláteis (Ross *et al.*, 2002; Jay, 2005).

Bactérias ácido-láticas têm um histórico de uso seguro em alimentos e têm sido usadas desde a antiguidade, inicialmente de forma não intencional, para transformar matéria prima em alimentos (Oliveira, 2012). Algumas BAL podem ser consideradas como micro-organismos probióticos, que podem ser definidos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Os benefícios resultantes do uso de micro-organismos probióticos em derivados lácteos, principalmente queijos, estão relacionados à melhoria de características sensoriais e de segurança microbiológica do alimento no qual foi adicionada a cultura probiótica (Assis, 2010). As BAL são consideradas micro-organismos benéficos que contribuem em alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação dos queijos: transformando lactose em ácido lático, e liberando enzimas proteolíticas que atuam na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades sensoriais do produto final. Em queijos fabricados com leite pasteurizado, as BAL podem ser adicionadas no início da fabricação, os que utilizam leite cru já apresentam essas bactérias em sua matéria prima, como ocorre no caso dos queijos artesanais (Beresford *et al.*, 2001).

A fermentação das BAL reduz o pH do meio, inibindo o crescimento de outros micro-organismos, principalmente os patogênicos. Além dessa acidificação, elas produzem

substâncias antagonistas aos micro-organismos indesejáveis, entre elas as bacteriocinas (Riley e Wertz, 2002).

Diversos autores enfatizaram a importância da utilização de culturas probióticas em queijos e seus efeitos antibacterianos e antifúngicos (Ross *et al.*, 2000; Dabiza e El-Deib, 2007; Abdalla *et al.*, 2008). Assis (2010) testou o efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* na viabilidade e produção de enterotoxina B por *Staphylococcus aureus* observando a diminuição do potencial toxigênico de *S. aureus*. Oliveira (2012) avaliou queijos artesanais da Serra da Canastra quanto a presença de *Staphylococcus* spp. e de genes potencialmente produtores de toxinas estafilocócicas e seu comportamento frente a presença de *Lactobacillus* spp., tendo como resultado a inibição do crescimento de amostras de *Staphylococcus* spp. e ausência de gene produtor de enterotoxina.

Costa (2010) e Andrade (2012) constataram elevado potencial antagonista *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra contra bactérias de referência, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, principalmente pelos micro-organismos do gênero *Lactobacillus* spp. Além de controlar o crescimento de microbiota indesejável, as BAL podem ainda exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro quando apresentam características probióticas, como citado anteriormente. Dessa forma, torna-se importante o estudo das bactérias ácido-láticas bem como seus mecanismos de inibição de micro-organismos patogênicos.

3.5.1 Mecanismos de inibição promovidos por bactérias ácido-láticas

As BAL são capazes de produzir diversas substâncias que apresentam efeito antimicrobiano. Dentre essas substâncias destacam-se os ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas (Schulz *et al.*, 2003; Ouwehand e Vesterlund, 2004, Vásquez *et al.*, 2009).

3.5.1.1 Peróxido de Hidrogênio e Dióxido de Carbono

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um dos metabólitos liberados pelas bactérias ácido-láticas. A presença do oxigênio livre da molécula pode resultar na oxidação da membrana lipídica da bactéria patogênica, causando um aumento da permeabilidade da membrana e consequente desequilíbrio eletrolítico, levando a morte do micro-organismo (Byczkowski e Gessner, 1988; Piard e Desmazeaud, 1991).

Além disso, a produção de peróxido de hidrogênio consome oxigênio, baixando a oxigenação do meio, criando um ambiente anaeróbio, prejudicando assim a multiplicação de alguns micro-organismos aeróbios (Ouwehand e Vesterlund, 2004).

O oxigênio desprendido do peróxido pode atuar de duas formas. Uma delas é se ligando ao tiocianato, resultando em hipotiocianato, que tem ação antimicrobiana. Esse processo de oxidação é catalisado pela lactoperoxidase. E a outra maneira é esse oxigênio desprendido oxidar uma enzima do micro-organismo susceptível, que seja essencial para o metabolismo do mesmo, assumindo uma postura bactericida, caso essa enzima não seja vital para o funcionamento do metabolismo da bactéria, é considerado bacteriostático (Jay, 2005; Forsythe, 2013).

O dióxido de carbono (CO₂) é formado principalmente por bactérias heterofermentativas. Ele apresenta efeito antimicrobiano por duas possibilidades. Uma delas é a sua oxidação que forma um meio anaeróbio, impedindo o crescimento de micro-organismos aeróbios. A outra via de inibição ainda não é elucidada, mas parece ter relação com a inibição da descarboxilação enzimática que promove um acúmulo de CO₂ na camada lipídica, causando uma disfunção na permeabilidade da membrana (Jay, 2005).

Devido a essa atividade antimicrobiana, o CO₂ tem sido utilizado frequentemente como componente de embalagens de alimentos com atmosfera modificada. Bactérias Gram negativo têm se mostrado mais sensíveis à ação do CO₂ do que bactérias Gram positivo (Ouwehand e Vesterlund, 2004).

3.5.1.2 Diacetil

O diacetil (2,3-butanodiona) é proveniente da fermentação do citrato por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, sendo um importante composto responsável pelo incremento do sabor no alimento. Ele é o principal constituinte aromático da manteiga. Além disso, ele pode atuar também como antimicrobiano, inibindo o desenvolvimento de patógenos. Em 1927, Lemoigne descreveu a atividade antimicrobiana do diacetil contra *Bacillus* sp. Jay (2005) observou que seu efeito antimicrobiano é mais efetivo em pH<7, e pode ser inibido na presença de glicose, acetato e Tween 80. O diacetil apresenta maior efeito antimicrobiano sobre bactérias Gram-negativo e fungos, e menor eficácia em bactérias Gram-positivo (Piard e Desmazeaud, 1991; Ouwehand e Vesterlund, 2004).

3.5.1.3 Ácidos orgânicos

As bactérias ácido-láticas quando fermentam carboidrato podem produzir ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico (Jay, 2005). Segundo Guchte *et al.* (2002), a produção de ácidos orgânicos pela fermentação da glicose diminui o pH do alimento, e inibe o desenvolvimento de bactérias patogênicas ou deteriorantes, que na maioria das vezes não são capazes de crescer em baixos valores de pH, mantendo a boa qualidade dos alimentos fermentados. O ácido acético tem um poder maior de inibição para fungos e bactérias, enquanto que o ácido propiônico apresenta um forte efeito antimicrobiano principalmente para fungos. Esses dois ácidos apresentam maior eficácia antimicrobiana do que o ácido láctico. Isso pode ser explicado, em partes, pelo alto pka dos ácidos acético e propiônico em relação ao ácido láctico. Em um pH 4, apenas 11% do ácido láctico não são dissociados, enquanto que 85% do ácido acético e 92% do ácido propiônico não são dissociados. Quando esses três ácidos estão associados é provável que o ácido láctico atue principalmente na redução do pH do meio enquanto que os outros dois ácidos atuam efetivamente como antimicrobianos (Ouwehand e Vesterlund, 2004). De fato, associação entre ácido acético e ácido láctico tem sido observada na redução do crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Existem algumas suposições do comportamento desses ácidos. Uma delas é o fato de serem lipossolúveis e, por isso, se difundem através da membrana da célula. Outra possibilidade é a dissociação dos ácidos dentro da célula ao encontrar um pH próximo do neutro no citoplasma. Há ainda a possibilidade de liberação de prótons no citoplasma

promover a acidificação, inibindo o crescimento. Entretanto, alguns autores relatam que não é a translocação de prótons, mas sim a acumulação de ânions, a principal causa da redução do crescimento bacteriano (Ouwehand e Vesterlund, 2004; Forsythe, 2013). Em linhas gerais, os ácidos orgânicos estarão sempre interferindo na força protomotiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana (Forsythe, 2013).

3.5.1.4 Bacteriocinas

3.5.1.4.1 Conceito e propriedades químicas

As bacteriocinas foram identificadas pela primeira vez pelo cientista Gratia em 1925, sendo produzidas por *Escherichia coli* e denominadas colicina. Somente em 1928 foi identificada a primeira bacteriocina produzida por uma bactéria do grupo das BAL, a nisina, produzida por *Lactococcus lactis* (Cotter *et al.*, 2005).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis sintetizados no ribossomo das bactérias. Quando liberadas no meio extracelular apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram positivo, dentre elas importantes patógenos de veiculação alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Alexandre *et al.*, 2002; Guedes Neto *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006). A produção delas ocorre de forma natural durante a fase logarítmica do crescimento microbiano ou ao final desta, possuindo relação direta com a biomassa produzida. As bacteriocinas apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre micro-organismos, sendo seu espectro de ação dependente da espécie alvo. A célula produtora sintetiza uma molécula que a torna imune contra sua própria bacteriocina (Vásquez *et al.*, 2009; Acuña *et al.*, 2012).

Recentemente, os estudos com bacteriocinas aumentaram pelo fato de apresentarem características antagonistas sobre micro-organismos patogênicos e por serem produzidas por bactérias ácido-láticas, que apresentam benefícios ao consumidor e podem facilmente serem adicionadas aos alimentos (Oliveira *et al.*, 2012).

Segundo Holzapfel e colaboradores (1995), para que uma bacteriocina possa ser utilizada aproveitando-se todo seu potencial, a mesma deverá cumprir alguns quesitos importantes, como ser termoestável, não apresentar risco à saúde do consumidor (*Generally Recognized As Safe* – GRAS), apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles e ter efeito benéfico sobre o produto aumentando sua segurança.

Geralmente as bacteriocinas atuam de maneira mais eficaz contra bactérias Gram positivo, pois a membrana externa de bactérias Gram negativo funciona como uma barreira permeável para a célula, dificultando e/ou impedindo que essas moléculas alcancem à membrana citoplasmática microbiana (Oliveira *et al.* 2012). Entretanto, Parada *et al.* (2007) descrevem alguns estudos que mencionaram atividade bacteriocinogênica contra bactérias Gram-negativo, como plantaricin 35d produzida por *Lactobacillus plantarum* e ativo contra *Aeromonas hydrophila*, e inibição de *Escherichia coli* por uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

O grupo das bacteriocinas é composto por uma diversidade de proteínas classificadas quanto ao tamanho, alvo microbiano, modo de ação e mecanismos de imunidade, sendo dividido em bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivo e bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativo (Gordon *et al.*, 2007; Heng *et al.*, 2007).

3.5.1.4.2 Produção de bacteriocinas

A produção de bacteriocinas não está totalmente elucidada, entretanto um dos possíveis fatores está relacionado com a competição entre micro-organismos pelas mesmas fontes de nutrientes, permitindo que a célula produtora se estabeleça em detrimento do outro micro-organismo (Jeronymo, 2013). Um dos mecanismos de produção das bacteriocinas pode ter relação com *quorum sense*, no qual as células presentes no ambiente produzem moléculas sinais (autoindutoras) em função da densidade populacional, regulando a expressão de genes reguladores de fatores de virulência (Sola *et al.*, 2012). Quando a concentração celular do micro-organismo produtor excede um limiar, a expressão dos genes desse micro-organismo é induzida a produzir e liberar o composto antimicrobiano no meio extracelular, podendo atuar no micro-organismo alvo (Eijsink *et al.*, 2002; Turovskiy *et al.*, 2007).

Os genes codificadores das bacteriocinas são muitas vezes organizados em operons compostos por genes, que podem ser localizados no cromossomo, em plasmídeos ou transposons (Jeronymo, 2013). A síntese de bacteriocinas envolve quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o responsável pela produção das proteínas do transporte ABC que externalizam a bacteriocina e, por fim, o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina. A específica função dessa proteína acessória não é conhecida (Nes *et al.*, 1996; Rosa e Franco, 2002).

Elas são sintetizadas, geralmente, como pré-peptídeos inativos que apresentam uma sequência guia N-terminal, e são transportados à superfície celular durante a fase de crescimento exponencial. Esses pré-peptídeos apresentam uma sequência de 18 a 27 aminoácidos, contendo duas glicinas na região N-terminal. Essa sequência de aminoácidos é importante para evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora, além de servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas do transporte ABC. O transportador ABC responsável por essa etapa contém uma porção proteolítica N-terminal, responsável por clivar o peptídeo, além de uma porção C-terminal que hidrolisa o ATP, fornecendo energia (Nes *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2008). O sistema responsável por regular a produção das bacteriocinas é composto por: peptídeo indutor (ferormônio ou fato de ativação), histidina quinase transmembrana (receptor do ferormônio) e regulador de resposta, conforme demonstrado na figura 2 (Nes *et al.*, 1996).

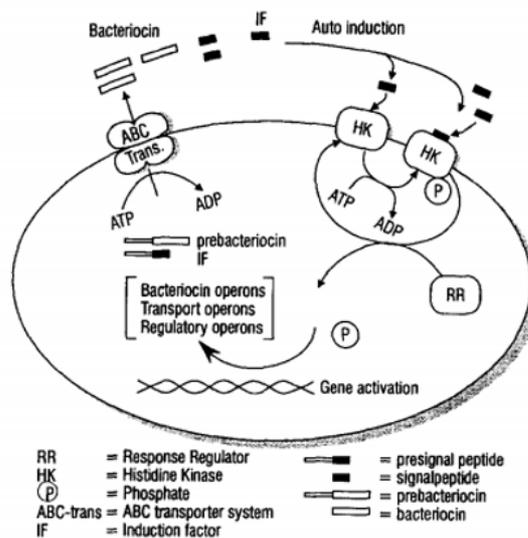


Figura 2: Mecanismo de regulação da biossíntese de bacteriocinas. Fonte: Nes *et al.*, 1996

O peptídeo indutor é sintetizado no ribossomo em baixos níveis como pré-peptídeo, posteriormente, é clivado e secretado no meio externo pelo transportador ABC. Quando atinge certa concentração, ativa a histidina quinase transmembrana, que conduz a uma autofosforilação do resíduo de histidina, transferindo para proteína reguladora de resposta um fosfato. Este regulador fosforilado ativa a transcrição da bacteriocina, além dos elementos que compõem o sistema regulador, iniciando um feedback positivo (Nes *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2008).

A produção das bacteriocinas depende de fatores relacionados às condições de incubação como a temperatura, o pH e o tempo. A composição do meio de crescimento também interfere diretamente nessa produção. Geralmente os meios mais ricos em nutrientes, que contém boa fonte de nitrogênio, ou o aumento de nutrientes, são ótimos para uma maior produção de bacteriocinas (Oliveira *et al.*, 2012).

A atividade das bacteriocinas nos alimentos não é uniforme e nem constante, pois depende da composição química e das condições físicas dos alimentos. Mudanças na carga eletrostática, a sua ligação aos componentes do alimento, ação do pH, inativação por proteases e mudanças na parede ou na membrana celular dos micro-organismos são fatores que interferem nessa atividade (Schulz *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2008).

3.5.1.4.3 Mecanismo de ação das bacteriocinas

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, variando principalmente de acordo com a espécie bacteriana e suas condições de crescimento do que uma característica relacionada à sua própria molécula. A ação pode promover um efeito letal bactericida, sem lise ou com lise celular, ou ainda inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (Schulz *et al.*, 2003).

A maioria das bacteriocinas de BAL apresenta um mecanismo de ação comum, se ligando a receptores na membrana celular da bactéria alvo. Em seguida, ocorre inserção das bacteriocinas na membrana causando dissipação da força próton-motriz e agregação de monômeros, com modificações no potencial de membrana e no gradiente de concentração de H⁺. Esses efeitos levam à formação de poros na membrana citoplasmática provocando a saída de compostos pequenos ou altera a força próton-motora necessária para a produção de energia, síntese de proteínas, síntese e rotação dos flagelos, transporte de proteínas etc (Bruno e Montville, 1993; Martins *et al.*, 2006; Delboni, 2009).

A única bacteriocina que a legislação brasileira permite o uso comercial como agente natural de conservação de alimentos é a nisina (Brasil, 1996a). A ação da nisina sobre células de micro-organismos Gram-positivo geralmente ocorre em duas etapas. A primeira envolve a adsorção não-específica da nisina sobre a parede celular do micro-organismo. Essa etapa é reversível e depende do pH (3,0-6,5), da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática do micro-organismo, da presença de cátions divalentes e trivalentes (Mg⁺², Ca⁺² e Gd³⁺) e da concentração utilizada. Em uma segunda etapa, a nisina torna-se insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis. Os poros se formam pela atração da nisina aos fosfolipídios na membrana. Ao mesmo tempo, ocorre também despolarização da membrana que causaria um rápido efluxo de moléculas essenciais (íons K⁺, aminoácidos e ATP), levando a uma série de alterações que resultariam na lise celular (Moreno *et al.*, 1999).

A eficiência inibitória das bacteriocinas está relacionada ao grau de contaminação do alimento. A atividade da bacteriocina é restrita, não impedindo o desenvolvimento do micro-organismo, caso a contaminação inicial seja muito elevada (Sarika *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de bactérias utilizadas

Os micro-organismos utilizados foram duas amostras padrão de *S. aureus*, uma produtora de SEC (FRI361) e outra de TSST-1 (N315), e duas amostras de BAL, uma isolada de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, *Lactobacillus rhamnosus* (D1) e, outra de leite cru, *Weissella paramesenteroides* (GIR16L4*), as quais foram identificadas molecularmente (PCR ARDRA 16S-23S rRNA) por Costa *et al.* (2013) e Silva (2016), respectivamente. A FRI361, produtora de SEC, foi escolhida pela alta incidência dessa enterotoxina em alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica (Mehrotra *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2013; Silva, 2013). A N315, produtora de TSST-1, foi escolhida pela necessidade de estudos sobre essa toxina, uma vez que já foi descrita sua ação emética em experimento com macacos (Schlievert *et al.*, 2000), além da alta ocorrência dessa toxina em associação com enterotoxinas em alimentos.

4.2. Curva de crescimento

As amostras de micro-organismos foram submetidas a uma curva de crescimento, em triplicata e duas repetições, para padronização do inóculo apresentando uma concentração de 10^8 UFC/mL. As culturas de estafilococos foram descongeladas, ativadas previamente em caldo BHI e incubadas a 37°C/24h, posteriormente inoculadas 100µL em 10 mL de caldo BHI. Esse inóculo foi incubado a 37°C/18h, sendo que alíquotas de 100µL foram retiradas e estriadas em placas de Petri contendo ágar Baird Parker (Difco) nos tempos 0h, 04h, 08h, 10h, 12h, 14h, 16h e 18h. As placas foram incubadas a 37°C e as contagens realizadas 48h após os respectivos tempos de incubação. As culturas de BAL foram submetidas ao mesmo processo, entretanto foi utilizado caldo MRS, e placas de Petri com meio MRS ágar.

4.3. Antagonismo *in vitro*

Os micro-organismos foram submetidos ao antagonismo *in vitro* com o objetivo de identificar o potencial inibitório das BAL diante dos *S. aureus* utilizados. A técnica utilizada foi uma adaptação da metodologia relatada por Tagg *et al.* (1976), realizada em triplicata em duas repetições. Quando as BAL foram utilizadas como bactérias produtoras os estafilococos foram utilizados como bactérias reveladoras e vice-versa.

As amostras de BAL foram descongeladas e ativadas em caldo MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos) e incubadas a 37°C/24h, sob aerobiose. Após dois cultivos consecutivos, 5µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS (Difco) e, posteriormente, incubadas a 37°C/48h, sob aerobiose. O objetivo dessa etapa foi formar o *spot*, que representa o crescimento da BAL produtora de possíveis substâncias de caráter antagonista. Em seguida, as bactérias produtoras foram inativadas pela adição de clorofórmio às tampas das placas de Petri, sendo posteriormente mantidas sob a luz ultravioleta por 30 minutos.

As amostras reveladoras foram cultivadas duas vezes consecutivas, e incubadas em caldo BHI (Difco). Dez µL do cultivo das reveladoras foram adicionados em tubos contendo

3,5mL de ágar semisólido (0,75% de Bacto ágar, Difco, em caldo BHI, Difco) e vertidos nas placas de Petri incubadas a 37°C/24h, sob aerobiose. Posteriormente, aferiu-se o halo de inibição proveniente de substâncias antagonistas oriundas dos spots das bactérias produtoras contra as bactérias reveladoras por um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper). Quando os estafilococos foram utilizados como bactérias produtoras e as BAL reveladoras, realizou-se procedimento semelhante utilizando-se meio respectivo para cada classe de micro-organismo.

4.4. Simulação de ambiente ácido em queijo

As culturas de *S. aureus* foram submetidas posteriormente à uma curva de sensibilidade em presença de ácido lático, em triplicata e duas repetições. As amostras foram descongeladas e ativadas em caldo BHI a 37°C/24h, posteriormente inoculados 1mL de amostra em 100mL de caldo BHI acrescido de ácido lático, nas concentrações 0,1%, 0,2% e 0,3%. Os inóculos foram incubados a 37°C/18h, sendo que alíquotas de 100µL foram retiradas e estriadas em placas de Petri contendo ágar Baird Parker (Difco) nos tempos 0h, 04h, 08h e 18h. As placas foram incubadas a 37°C e as contagens realizadas 48h após os respectivos tempos de incubação.

4.5 Elaboração dos queijos

Um total de 81 queijos foram produzidos em laboratório, sob condições de esterilidade, utilizando-se três lotes distintos de leite em pó desnatado, reconstituído a 15% em água destilada estéril, conforme fluxograma apresentado na Figura 3, constituindo-se três repetições do experimento. Todo o utensílio utilizado, assim como a água utilizada na reconstituição do leite em pó, foi esterilizado em autoclave à 121°C por 20 minutos. A escolha do leite em pó desnatado, se deu pelo fato de que a gordura presente em um leite integral poderia sofrer lipólise, conseqüente liberação de ácidos graxos voláteis e inibição dos micro-organismos adicionados ao queijo.

O leite em pó foi analisado quanto à presença de inibidores segundo o método do cloreto 2,3,4 cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (Neal e Calbert, 1955), contagens de *S. aureus* (Lancette e Tatini, 2001), BAL (MacFaddin, 1980), presença *Salmonella* spp. (Andrews *et al.*, 2001) e número mais provável (NMP) de coliformes (Kornacki e Johnson, 2001). Em relação à presença de enterotoxinas estafilocócicas no leite em pó, foi realizada reação de PCR utilizando-se 10 pmol de cada primer *sec* e *tsst*, 25ng de DNA, nas seguintes condições: 95°C/2min, 35 ciclos de 95°C/30seg, 55°C/1min, 72°C/1min e extensão final 72°C/5min.

Oito tratamentos foram realizados, variando-se as combinações entre duas amostras de *S. aureus* e duas amostras de BAL, além de um tratamento controle, sem a adição de micro-organismos (tabela 1). Os inóculos de *S. aureus* e das BAL foram padronizados a uma concentração de 10⁸ UFC/mL, sendo preparados após ativações das bactérias em caldos BHI (DIFCO, Detroit, Estados Unidos) e MRS (DIFCO, Detroit, Estados Unidos) respectivamente. Essa concentração foi escolhida levando-se em consideração as perdas que poderiam ocorrer do inóculo no soro, de forma que mesmo com essas perdas, a concentração não ficasse abaixo de 10⁵ UFC/mL, que conforme literatura descrita anteriormente é a quantidade mínima necessária para produção de enterotoxinas. Os

inóculos de *S. aureus* foram preparados segundo protocolo utilizado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), padronizado por Cunha Neto (2004).

A primeira ativação foi realizada retirando-se 2mL do inóculo do freezer e incubando-o a 37°C por 24h, e após 2mL aliqotado e transferido para 10mL de caldo BHI acrescido de 1% de extrato de levedura e incubado a 37°C por 18h a 150rpm.

Uma quantia de 150 g de leite em pó foi pesada e reconstituída em 850mL de água destilada estéril, aquecida a 40°C, para se obter 1 litro de leite reconstituído a 15%. Essa concentração foi escolhida por ser a que apresentou maior estabilidade de coágulo durante a produção dos queijos, após testes realizados em laboratório. O leite reconstituído permaneceu em repouso a 37°C por 20 minutos para completa dissolução do mesmo. Após esse período foi adicionado 10mL do inóculo, referente a cada tratamento, e aguardou-se 15 minutos para que os micro-organismos adicionados se adaptassem ao ambiente. Foi adicionado então, 1mL de coalho e 0,5mL de solução de CaCl₂ 50%. Esperou-se 40 min para formação do coalho, seguido de corte da massa em 1cm². Sendo realizada a mexedora lenta por 5 min e mexedora rápida por mais 5 min, com o objetivo de eliminar o máximo possível de soro. Após a dessoragem os queijos foram enformados e salgados com 1 g de sal para cada peça de queijo, que foram armazenados em geladeira B.O.D. previamente higienizada com solução de cloro a 200ppm, a 7°C por 14 dias.

Tabela 1. Combinação dos inóculos de *S. aureus* e bactérias ácido-láticas utilizados na elaboração dos queijos

Tratamento	Inóculo	Contagem (UFC/mL)
01	Sem adição de bactérias	-
361	<i>S. aureus</i> (FRI361)	10 ⁸
315	<i>S. aureus</i> (N315)	10 ⁸
361WP	<i>S. aureus</i> (FRI361) + <i>W. paramesenteroides</i>	10 ⁸
361LR	<i>S. aureus</i> (FRI361) + <i>L. rhamnosus</i>	10 ⁸
315WP	<i>S. aureus</i> (N315) + <i>W. paramesenteroides</i>	10 ⁸
315LR	<i>S. aureus</i> (N315) + <i>L. rhamnosus</i>	10 ⁸
361WPLR	<i>S. aureus</i> (FRI361) + <i>W. paramesenteroides</i> + <i>L. rhamnosus</i>	10 ⁸
315WPLR	<i>S. aureus</i> + <i>W. paramesenteroides</i> + <i>L. rhamnosus</i>	10 ⁸

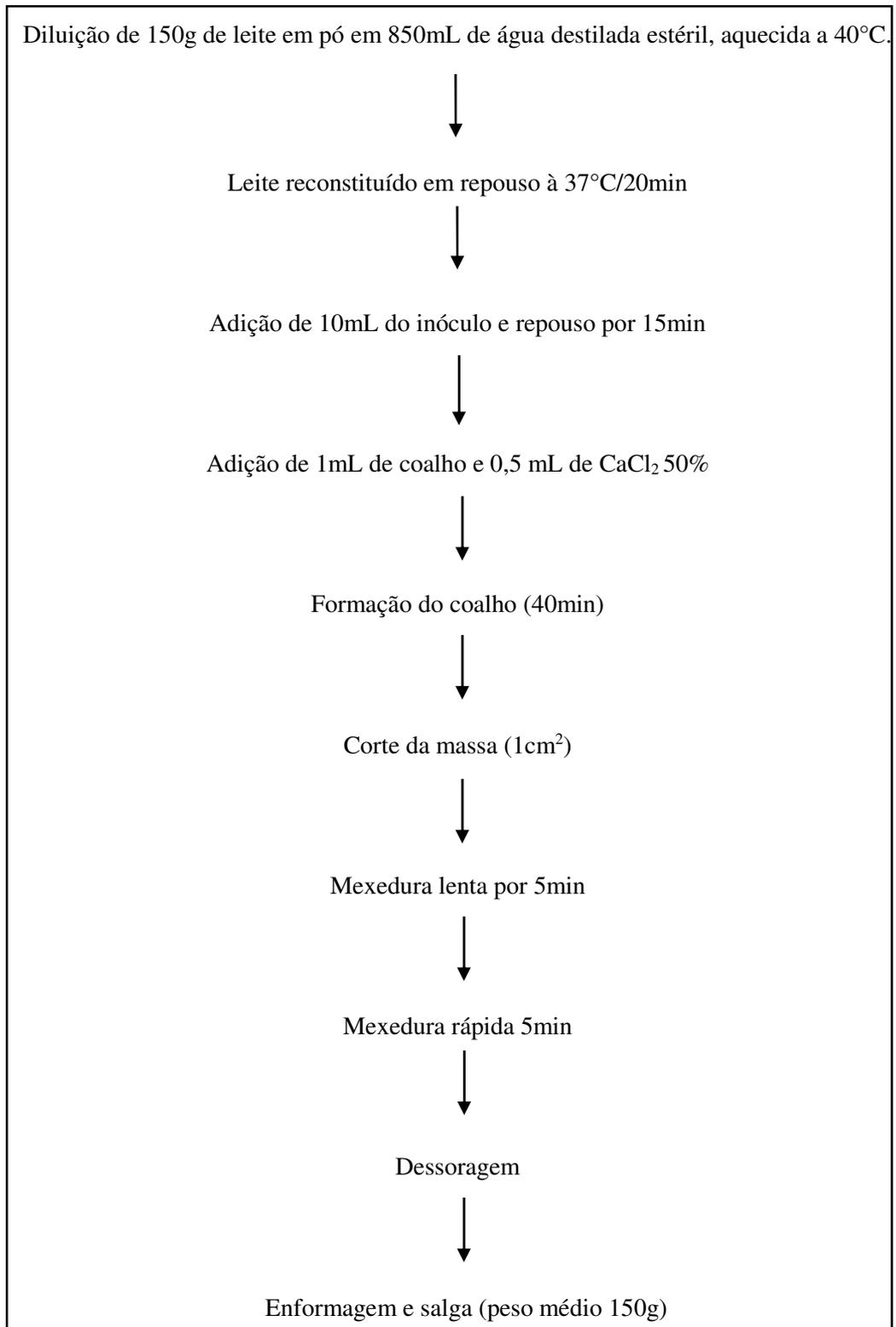


Figura 3: Fluxograma de elaboração dos queijos.

4.6 Análises físico-químicas e microbiológicas

No dia da produção dos queijos foram analisadas microbiologicamente amostras dos inóculos utilizados, bem como do soro drenado dos queijos de todos os tratamentos. Alíquotas de 1mL foram pipetadas tanto do inóculo, quanto do soro, e diluídas em 9mL de solução salina (0,85%) peptonada (0,1%), correspondendo à diluição 10^{-1} , e em seguida realizada diluição seriada até 10^{-7} para os inóculos e 10^{-5} para o soro. O plaqueamento utilizado foi *spread plate* em placas de Petri contendo ágar Baird Parker para contagem de *S. aureus* (Lancette e Tatini, 2001) e em placas contendo ágar MRS para a contagem de BAL (McFaddin, 1980).

Os queijos foram analisados nos tempos 01, 07 e 14 dias após o processamento. As análises físico-químicas realizadas foram: determinação dos teores percentuais de umidade pelo método gravimétrico (FIL-IDF, 1982) e compostos nitrogenados pelo método de Kjeldahl (FIL- IDF, 1983) apenas para os queijos controle, além de acidez titulável (Merck, 1993) e pH com fita para todos os tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as análises microbiológicas, os queijos foram pesados (10g), obtendo-se partes da casca e interior dos mesmos, triturados e diluídos em 90mL de solução salina peptonada (0,1%), correspondendo à diluição 10^{-1} . Em seguida, foi realizada a diluição seriada até 10^{-6} e o plaqueamento por *spread plate* em placas de Petri contendo ágar Baird Parker (Difco) para contagem de *S. aureus* (Lancette e Tatini, 2001) e em placas contendo ágar MRS (Difco) para a contagem de BAL (McFaddin, 1980).

4.7 Análises moleculares

4.7.1 Extração de RNA e qPCR

Os queijos foram analisados nos tempos 01, 07 e 14 dias após o processamento. Eles foram pesados (3g), obtendo-se partes da casca e do interior, triturados e diluídos em 27mL de solução de citrato de sódio 2% e submetidos à extração de RNA segundo metodologia de Ulve *et al.* (2008). Os RNA extraídos foram quantificados em NanoDrop® (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Inc., Waltham, United States), levando em consideração as razões de absorbância de 280/260 e 260/230nm, posteriormente diluídos em água livre de RNase para 250ng. As amostras de RNA foram avaliadas qualitativamente em gel de agarose 1% por eletroforese. As amostras de RNA (1µg) foram tratadas com turbo DNase (Ambion, Austin, United States) e em seguida submetidas a transcrição reversa usando *kit high-capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems, Foster City, United States), seguindo recomendações do fabricante.

As amostras de cDNA foram amplificadas por PCR em tempo real utilizando-se SYBR Green PCR *Master Mix 2x kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) de acordo com recomendações do fabricante. Primers específicos para os genes *sec* e *tsst*, bem como gene de referência rRNA 16S foram utilizados nas reações (tabela 2), usando o ABI Prism 7900 HT *sequence detection system*. Os resultados foram avaliados com o *Sequence Detection software* Version 2.4 (Applied Biosystems). Para padronização das

reações, curvas foram preparadas utilizando-se um pool das amostras com as seguintes diluições do cDNA: 1; 2; 4 e 8 ng (SEC), 1; 10; 100; 1000; 10000ng (TSST-1 e 16S).

As condições das reações seguiram o protocolo universal contendo os seguintes passos: etapa inicial 50°C/2min; 95°C/10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C/15s e 60°C/1min. A curva de dissociação foi obtida usando os passos 95°C/15s, 60°C/15s e 95°C/15s. Placas MicroAmp Optical 96-cell Reaction seladas com o seltante MicroAmp Optical Adhesive Film (Life Technologies Corp.) foram usadas nas reações.

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de qPCR para identificação da expressão das toxinas

Gene alvo	Sequência de <i>primer</i>	Primer ($\mu\text{ml l}^{-1}$)	Eficiência (%)	Amplicon (pb)	Referência
TSST-1	F: TTC ACTATTTGTAAA AGTGTCAGACCCACT R: TACTAATGAATTTTT TTATCGTAAGCCCTT	2,0	100,25	180	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
SEC	F: AATAAAACGGTTGA TTCTAAAAGTGTGAA R: ATCAAAATCGGATTA ACATTATCCATTC	1,5	96,70	80	Klots <i>et al.</i> , 2003
16S	F:CNACGCGAAGAAC CTTANC R: CGACAGCCATGCAN CACCT	0,3	93,07	98	Huse <i>et al.</i> , 2008

Análises moleculares posteriores foram realizadas com as amostras de queijos referentes ao tratamento 01 (controle) com a finalidade de confirmar a ausência de *S. aureus* nos queijos controle. Para isso foram utilizados *primers* específicos para estafilococos coagulase positivo (*coa*) e para *S. aureus* (*femA*) (tabela 3). Amostras dos queijos provenientes dos tratamentos 361 e 315 foram utilizadas como controle positivo, uma vez que esses tratamentos foram inoculados apenas com *S. aureus* em sua elaboração. Os cDNA foram amplificados por PCR utilizando-se 20 pmol de cada primer *coa* e *femA*, 25ng de cDNA, nas seguintes condições: 95°C/2min, 35 ciclos de 94°C/2min, 56°C/2min (*coa*) ou 57°C/2min (*femA*), 68°C/1min e extensão final 72°C/7min.

Posteriormente, os cDNA foram amplificados por qPCR para averiguar se houve expressão das toxinas estudadas (SEC e TSST-1) uma vez que elas podem ser expressas por amostras de estafilococos coagulase negativo. As condições utilizadas na reação seguiram o protocolo universal contendo os seguintes passos: etapa inicial 50°C/2min; 95°C/10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C/15s e 60°C/1min. A curva de dissociação foi obtida usando os passos 95°C/15s, 60°C/15s e 95°C/15s. Placas MicroAmp Optical 96-cell Reaction seladas com o seltante MicroAmp Optical Adhesive Film (Life Technologies Corp.) foram usadas nas reações.

Tabela 3: Primers utilizados na reação de PCR para identificação de genes específicos para *S. aureus*

Gene alvo	Sequência de <i>primer</i>	Aplicon (pb)	Referência
<i>Coa</i>	F: CCG CTT CAA CTT CAG CCT AC R: TTA GGT GCT ACA GGG GCA AT	204	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005
<i>femA</i>	F: AAAAAAGCACATAACAAGCG R: GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000

4.8 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi elaborado segundo esquema fatorial 9x3, sendo nove combinações de micro-organismos (tabela 1) e três tempos de estocagem dos queijos, em três repetições. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância com o teste Duncan, para comparação das contagens de BAL e teste SNK para comparação das contagens de *S. aureus*, considerando nível de significância de 5%.

Para avaliação dos parâmetros físico-químicos, foi utilizado o Teste de Friedman com 5% de nível de significância.

Para comparar resultados das análises moleculares foi utilizado Two-wayAnova para avaliar os tratamentos entre si, dentro de cada tempo, e One-wayAnova para avaliar cada tratamento ao longo do tempo, ambos com 5% de nível de significância, e pós Teste de Tukey usado para múltiplas comparações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento

A análise da curva de crescimento demonstrou que a partir de 4h de incubação a 37°C os micro-organismos avaliados foram capazes de atingir a concentração desejada de 10^8 UFC/mL (figura 5).

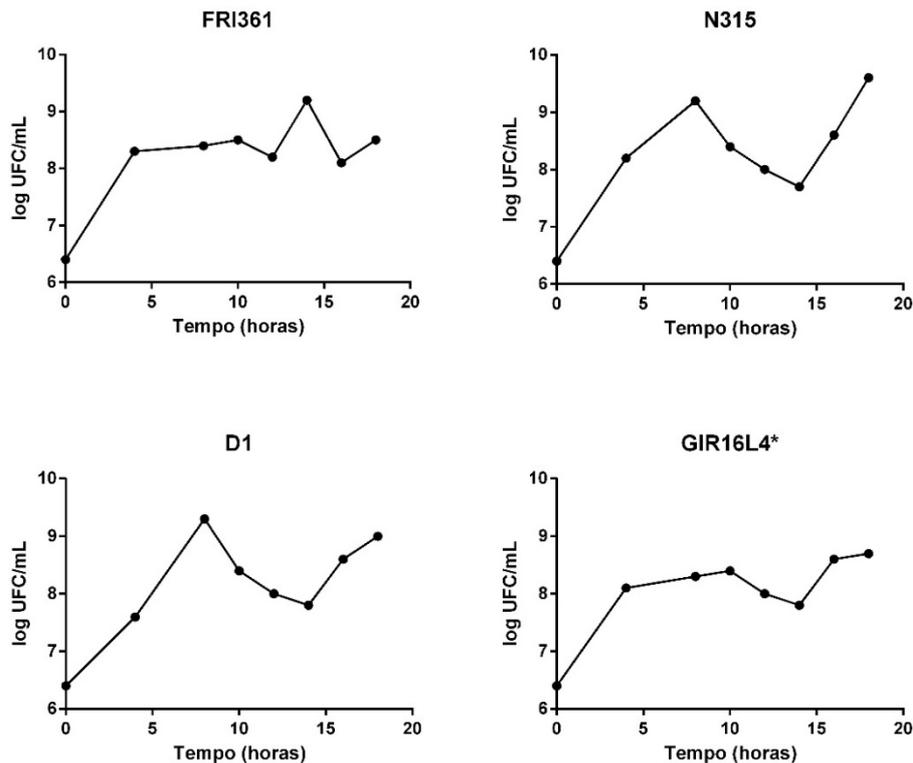


Figura 5: Curva de crescimento dos inóculos utilizados na produção dos queijos, em log UFC/mL

5.2 Antagonismo *in vitro*

No antagonismo realizado entre *S. aureus* como produtora e BAL como reveladoras não foi observada inibição, uma vez que não houve formação de halos de inibição passíveis de serem aferidos com paquímetro. Entretanto, quando avaliado BAL produtora e *S. aureus* reveladora observou-se halo de inibição ($p < 0,05$) (figura 4). O teste estatístico utilizado foi Two-way anova com pós teste de tukey, com 95% de significância. O *L. rhamnosus* (D1) promoveu uma maior inibição no crescimento de *S. aureus* N315, uma vez que seu halo de inibição apresentou aumento significativo em relação aos outros micro-organismos testados ($p < 0,05$). Já a *W. paramesenteroides* (GIR16L4*) apresentou maior efeito inibitório para *S. aureus* FRI361, que formou um halo de inibição maior do que em relação aos outros micro-organismos ($p < 0,05$).

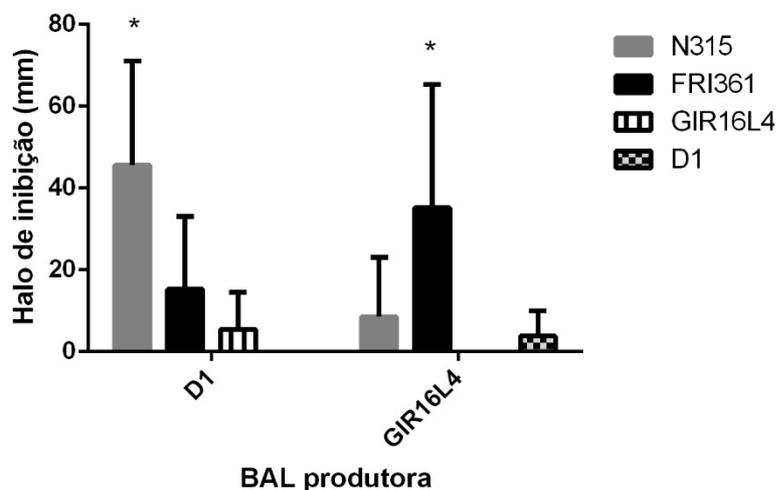


Figura 4. Antagonismo *in vitro* entre BAL produtoras e *S. aureus* reveladoras expresso pela medida do halo de inibição. (*) indica diferença significativa pelo teste de Tukey, com 5% de significância

5.3 Simulação de ambiente ácido em queijo

As culturas de *S. aureus* mesmo em presença de ácido láctico (0,1%, 0,2% e 0,3%) foram capazes de se multiplicar em caldo BHI incubadas a 37°C por 18h (figura 6). Comportamento semelhante foi observado nos queijos quando notou-se o crescimento de *S. aureus* mesmo em presença de BAL, ao longo dos 14 dias. Esses resultados contrariam diversos autores que verificaram a inibição do crescimento de *S. aureus* em decorrência da acidez promovida por BAL (Alomar *et al.*, 2008; Charlier *et al.*, 2008; Al-Delaimy e Hamamdeh, 2013; Hor e Liang, 2014; Nouaille *et al.*, 2014), levantando a hipótese de que um possível mecanismo de inibição dessas BAL frente os *Staphylococcus* utilizados foi a ação de bacteriocinas.

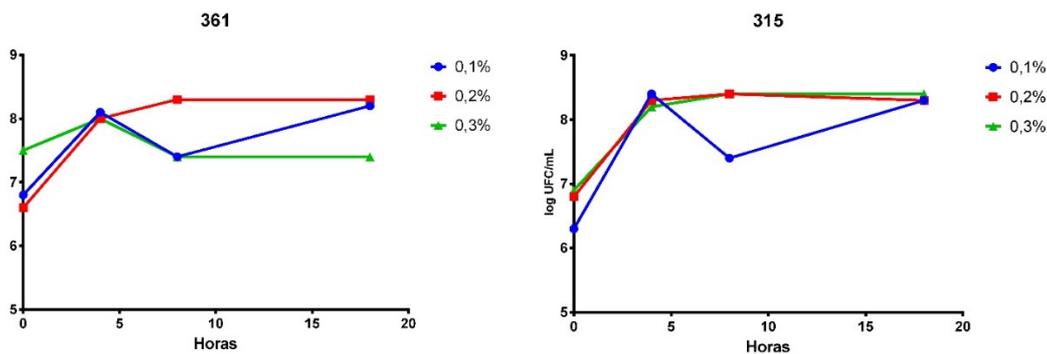


Figura 6: Crescimento de *S. aureus* em presença de ácido láctico (0,1%, 0,2% e 0,3%) em log UFC/mL

5.4 Análises físico-químicas

Os queijos apresentaram 72,47%, 71,16% e 73,79% de umidade, e 16,29%, 15,12% e 15,56% de proteína, nos dias 01, 07 e 14, respectivamente, estando de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira para um queijo de muito alta umidade (BRASIL, 1996b). Os resultados médios das análises de acidez titulável e de pH de todos os tratamentos podem ser vistos nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 Médias de acidez titulável (% de ácido láctico) em queijos elaborados com BAL e *S. aureus* e estocados a 7°C por 01, 07 e 14 dias

QUEIJOS	DIA 01	DIA 07	DIA 14
01	0,03433Aa	0,029433Ba	0,037767BCa
361	0,02093BCDa	0,0355Ba	0,021633Ca
315	0,01753DEa	0,030033Ba	0,019767Ca
361WP	0,0212CDEc	0,052ABb	0,206733ABa
361LR	0,02247BCa	0,041767Ba	0,0703Ba
315WP	0,01963CDEa	0,048767ABa	0,068667BCa
315LR	0,01447Ec	0,0377Bb	0,063067Ba
361WPLR	0,02797Bb	0,094867Aa	0,153567Aa
315WPLR	0,02693ABc	0,056833ABb	0,143433Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna, e minúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Friedman considerando 5% de significância (3 repetições)

Tabela 5. Médias de pH em queijos elaborados com BAL e *S. aureus*, estocados à 7°C 01, 07 e 14 dias

QUEIJOS	DIA 01	DIA 07	DIA 14
01	7A	7A	7 ^a
361	7Aa	7ABa	6,5Aa
315	7Aa	7Aa	6,5Aa
361WP	6,5BCa	6BCa	6,3Aa
361LR	7Aa	6BCab	5,5Bb
315WP	6,6Aba	5,8CDa	5,5Ba
315LR	7Aa	6,5CDab	5,5BCb
361WPLR	5,7Ca	5,5Dab	5Cb
315WPLR	6,0Ca	5,5Dab	5Cb

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna, e minúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Friedman considerando 5% de significância (3 repetições). Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L. rhamnosus*), 315WP (*S. aureus* N315+ *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

Ao longo dos 14 dias, nota-se um aumento da acidez (tabela 3) nos queijos dos tratamentos 361WP, 315LR, 361WPLR e 315WPLR ($p < 0,05$), que pode ser justificado pela produção de ácidos pelas bactérias ácido-láticas utilizadas no estudo. Em relação ao pH (tabela 4) percebe-se uma redução, do mesmo, ao longo dos 14 dias nos tratamentos 361LR, 315LR, 361WPLR e 315WPLR ($p < 0,05$).

5.5 Contagens de micro-organismos

Os inóculos utilizados na produção dos queijos apresentaram contagens (tabela 6) satisfatórias dentro do preconizado previamente para a realização desse experimento.

Tabela 6: Médias de contagens de *S. aureus* e BAL nos inóculos utilizados na produção dos queijos, em log UFC/ml

INÓCULOS	<i>S. aureus</i>	BAL
FRI361	8,6	---
N315	8,1	---
D1	---	8,4
GIR16L4*	---	8,3

Os soros coletados durante a fabricação dos queijos foram analisados e apresentaram contagens altas (tabela 7) para os micro-organismos utilizados.

Tabela 7: Médias de contagens de *S. aureus* e BAL nos soros coletados de cada tratamento durante a produção dos queijos, em log UFC/mL

TRATAMENTOS	<i>S. aureus</i>	BAL
01	Nd*	Nd*
361	7,1	Nd*
315	7,1	Nd*
361WP	7,4	7,1
361LR	7,0	6,0
315WP	7,5	7,2
315LR	7,0	6,1
361WPLR	7,3	7,2
315WPLR	7,2	7,3

*Nd: não detectável.

Embora os queijos tenham sido produzidos adotando-se todos os critérios de esterilidade, houve contagem de BAL nos queijos pertencentes aos tratamentos 01 (controle), 361 e 315, em que não houve a inoculação de BAL, e contagem de *S. aureus* nos queijos do tratamento 01 (controle). Isso pode ser explicado por uma possível contaminação pós-processamento e/ou durante a fase de armazenamento dos queijos. Ademais, Bogdanovicová *et al.* (2017) avaliaram a sobrevivência e crescimento de *S. aureus* em leite em pó, após sua reconstituição. O leite em pó foi inoculado com 10^2 a 10^5 UFC/g de *S. aureus* enterotoxigênicos e o leite reconstituído foi armazenado por

48h à 4°C, 15°C e 25°C. O crescimento de *S. aureus*, bem como a produção de enterotoxinas SEA, SEB e SEC foram regularmente detectados, sendo que quanto maior a temperatura e inóculos utilizados, mais rápida foi detectada contagem e produção de toxinas. As contagens de BAL nos queijos pertencentes a esses tratamentos, nos dias 1 e 7 foram inferiores às contagens encontradas nos queijos dos demais tratamentos em que houve a inoculação de BAL na sua produção ($p < 0,05$). Porém, no dia 14 não houve diferença das contagens de BAL nos queijos entre os tratamentos realizados ($p > 0,05$).

Ao longo da estocagem, os queijos pertencentes ao tratamento 01 apresentaram um aumento da contagem de BAL do dia 1 para o dia 14 ($p < 0,05$) (tabela 8). Comportamento semelhante foi observado nos queijos submetidos ao tratamento 361, em que as contagens de BAL encontradas no dia 14 foram superiores às contagens dos dias 1 e 7 ($p < 0,05$). Para os queijos dos demais tratamentos não foi observada diferença na contagem de BAL entre os dias de estocagem ($p > 0,05$). A elevação da contagem de BAL ao longo da estocagem em queijos que não foram inoculados com BAL no seu processamento pode ser explicada pelos mesmos motivos de contaminação supramencionados. Seridan *et al* (2012) também encontraram resultados semelhantes em seu trabalho. Queijos pertencentes ao tratamento 01 apresentaram contagens de *S. aureus* inferiores aos outros tratamentos nos dias 1 e 7 ($p < 0,05$) (tabela 8). Esse resultado era esperado tendo em vista que os queijos pertencentes ao tratamento 01 foram os únicos não inoculados com *S. aureus* no estudo. Todavia, no dia 14, queijos do tratamento 01 não apresentaram contagens diferentes dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

Ao avaliar o período de estocagem, não houve diferença da contagem de *S. aureus* entre tratamentos ao longo dos 14 dias analisados ($p > 0,05$), à exceção do tratamento 01, em que houve aumento da contagem de *S. aureus* do dia 7 para o dia 14 ($p < 0,05$). Entretanto, o fato de a acidez dos queijos ter aumentado ao longo do tempo de estocagem parece não ter sido suficiente para reduzir o crescimento de *S. aureus*. No presente trabalho, o crescimento de *S. aureus* não foi afetado pela presença das BAL utilizadas, demonstrando que são amostras que resistem à ambientes ácidos ou que não se afetam pela presença de possíveis bacteriocinas. Esse dado é preocupante do ponto de vista de saúde pública, pois as contagens encontradas de *S. aureus* (tabela 9) são suficientes para produzir toxinas capazes de ocasionar intoxicações estafilocócicas (Jay, 2005).

Tabela 8. Médias das contagens *L. rhamnosus* e *W. paramesenteroides* (log UFC/g) em queijos elaborados com BAL e *S. aureus*, nos tempos 01, 07 e 14 dias e estocagem à 7°C

Tratamento	Bactérias ácido lácticas		
	Dia 01	Dia 07	Dia 14
01	<5,00Bb	6,03Bab	7,43Aa
361	5,49Bb	5,89Bb	6,87Aa
315	<5,00Ba	5,88Ba	7,03Aa
361WP	6,87Aa	7,85Aa	7,63Aa
361LR	6,84Aa	7,71Aa	7,46Aa
315WP	7,40Aa	7,63Aa	7,45Aa
315LR	6,99Aa	7,71Aa	7,35Aa
361WPLR	7,31Aa	7,86Aa	7,89Aa
315WPLR	7,28Aa	7,87Aa	7,72Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna, e minúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Duncan considerando 5% de significância (3 repetições). Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L. rhamnosus*), 315WP (*S. aureus* N315+ *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

Tabela 9. Médias das contagens de *S. aureus* (FRI361 e N315) (log UFC/g) em queijos elaborados com BAL e *S. aureus*, nos tempos 01, 07 e 14 e estocagem à 7°C

Tratamento	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Dia 01	Dia 07	Dia 14
01	<5,00Bb	5,73Bb	7,69Aa
361	7,08Aa	7,61Aa	7,56Aa
315	7,07Aa	7,58Aa	7,62Aa
361WP	7,32Aa	7,87Aa	7,73Aa
361LR	7,22Aa	7,82Aa	7,42Aa
315WP	7,49Aa	7,72Aa	7,59Aa
315LR	7,53Aa	7,46Aa	7,20Aa
361WPLR	8,03Aa	7,76Aa	7,66Aa
315WPLR	8,18Aa	7,61Aa	7,36Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna, e minúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste SNK considerando 5% de significância (3 repetições). Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L. rhamnosus*), 315WP (*S. aureus* N315+ *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

Quando se avalia o poder inibitório de BAL contra *S. aureus*, verificam-se resultados na literatura que mostram uma inibição eficaz. Na Espanha, Arqués *et al.* (2005) produziram queijos com leite cru, inoculados com *S. aureus* e BAL (*L. lactis* subsp *cremoris*, *L. lactis* subsp *lactis* e *Enterococcus faecalis*), e ao longo de 60 dias de maturação perceberam uma inibição do

crescimento de *S. aureus*. Na França, alguns autores têm pesquisado essa interação entre *S. aureus* e BAL. Alomar *et al* (2008) avaliaram o efeito de *Lactococcus garvieae*, *L. lactis* e *Enterococcus faecalis* sobre *S. aureus* em leite microfiltrado e viram que após 6h de incubação houve inibição do crescimento de *S. aureus*, devido provavelmente à presença de ácidos produzidos pelas BAL. Charlier *et al.* (2008) avaliaram o antagonismo entre *Lactococcus lactis* e dois isolados de *S. aureus* (um produtor de SEA, e outro portador do gene *agr*), em leite, constatando que houve uma inibição no crescimento das duas amostras de *S. aureus*. Segundo os autores, isso se deve a acidificação promovida pelo *L. lactis*, pois não foram encontradas bacteriocinas no meio analisado. Le Marc *et al.* (2009) observaram o efeito inibitório de culturas starter de BAL sobre *S. aureus*. Delbes-Paus *et al.* (2010) inocularam *Lactococcus garvieae* e *S. aureus* em caldo BHI, leite cru, leite pasteurizado e leite microfiltrado, com e sem catalase. Eles observaram a inibição do crescimento de *S. aureus* e sugeriram que a possível causa foi a presença de H₂O₂, pois em amostras que continham a catalase a inibição de *S. aureus* foi menor, devido à degradação de H₂O₂.

Nos EUA, Dimitrieva-Moats e Ünlü (2012) avaliaram a eficácia de bacteriocinas produzidas por BAL, em meio à base de leite, em reduzir o crescimento de *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, e concluíram que foram eficazes na redução da multiplicação dos patógenos avaliados. Na Jordânia, Al-Delaimy e Hamamdeh (2013) avaliaram a sobrevivência e a inibição de *Staphylococcus aureus* em iogurte, pela ação de culturas starter (*Sterptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrukii* subsp. *bulgaricus*) e *Bifidobacterium lactis*, e observaram que houve inibição completa de *S. aureus* a partir de seis dias de incubação. Apesar de não terem pesquisado o fator inibitório, os autores imaginam que a inibição ocorreu pela presença de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL. Segundo Sikorska e Smoragiewicz (2013) *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., são capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *in vitro* e *in vivo*. Eles relataram que a administração oral de *Bifidobacterium breve* inibiu o crescimento sistêmico de MRSA em ratos, e a administração vaginal de *Lactobacillus paracasei* preveniu doença urinária em ratos colonizados por *S. aureus*. Na Malásia, Yong *et al.* (2015) isolaram *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. bulgaricu*, *L. garvieae* e *Weissella confusa* de alimentos e avaliaram o efeito antimicrobiano de seus sobrenadantes celulares sobre *S. aureus*. Os autores concluíram que *L. plantarum* apresentaram melhor efeito antimicrobiano, porém estudos adicionais são necessários para caracterizar e identificar os compostos bioativos responsáveis por esse mecanismo.

5.6 Expressão gênica das toxinas

Quando se avalia a expressão do gene *tsst* pela amostra N315 (figura 7) observa-se que os queijos produzidos no tratamento 315 apresentaram redução da expressão do dia 01 para os dias 07 e 14 de estocagem ($p < 0,05$). Esse tratamento consiste em adição apenas de *S. aureus* (N315) na sua produção, e sugere alta expressão inicial de toxinas seguida de uma queda dessa expressão, o que pode ser explicado por uma tendência natural do micro-organismo em diminuir a expressão de fatores de virulência após estabilizar seu crescimento em determinado meio, na ausência de interferentes que poderiam estimular essa ação.

Nos tratamentos 315WP, 315LR e 315WPLR não houve diferença significativa na expressão do gene *tsst* ao longo dos 14 dias. Entretanto, essa expressão foi inferior à do queijo 315 no primeiro dia de estocagem ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado pela sensibilidade da amostra de *S. aureus*

diante da ação inibitória das BAL utilizadas, uma vez que, quando sozinha (tratamento 315), a expressão de toxina é alta, mas quando associada à BAL (tratamentos 315WP, 315LR e 315WPLR) sua expressão inicial já é baixa, o que pode ser um indicativo de que a amostra N315 apresenta alta sensibilidade frente a ação inibitória das amostras de *W. paramesenteroides* e *L. rhamnosus* utilizadas.

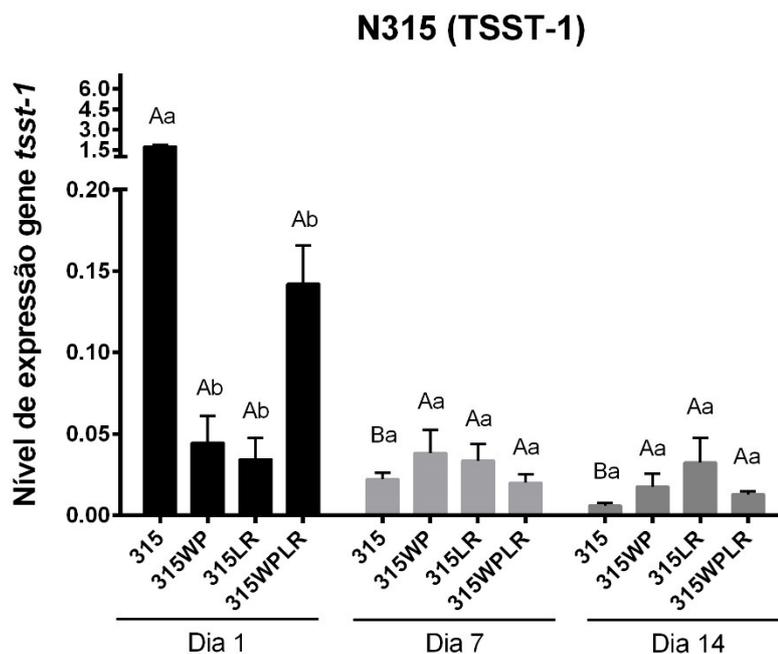


Figura 7: Nível de expressão da toxina TSST-1, pela cepa N315, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com *S. aureus*, *L. rhamnosus* e *W. paramesenteroides* estocados a 7°C. Médias seguidas por letras maiúsculas entre os tempos e por letras minúsculas entre os tratamentos, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L. rhamnosus*), 315WP (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

A amostra N315 é capaz de expressar além do gene *tsst*, o gene *sec*. Com esses resultados (figura 8) nota-se que ao longo dos 14 dias de estocagem o tratamento 315 apresentou diminuição na expressão do gene *sec* do dia 01 para os dias 07 e 14 ($p < 0,05$). Comportamento esse, semelhante ao observado na expressão do gene *tsst* pela mesma amostra. Nos demais tratamentos, observou-se diferença apenas no tratamento 315WPLR, entre os dias 1 e 07 e 1 e 14 ($p < 0,05$). Quando avaliada a expressão dentro de cada tempo, observa-se que nos dias 01 e 07, os queijos pertencentes ao tratamento 315 apresentaram maior expressão de *sec* em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). No dia 14 essa diferença não foi observada. A avaliação da expressão do gene *sec* e *tsst* por N315 demonstra resultados semelhantes, o que pode indicar um

comportamento característico da cepa de ser sensível a ação inibitória de *L. rhamnosus* e *W. paramesenteroides*.

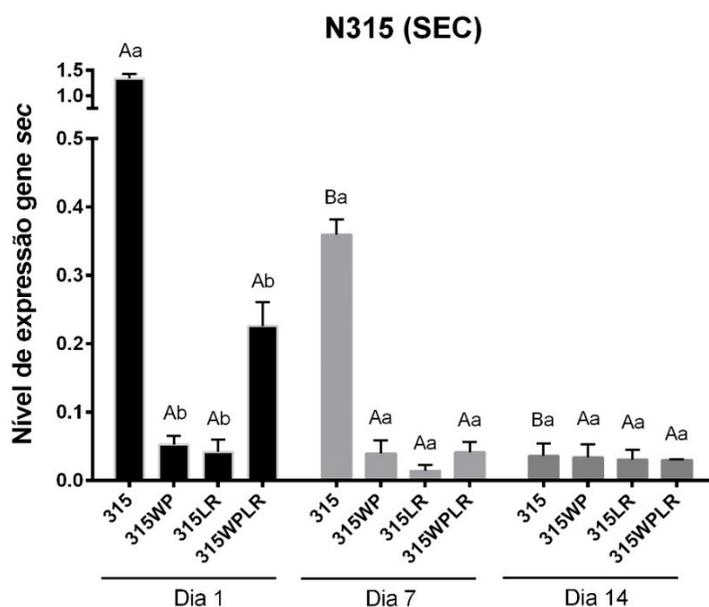


Figura 8: Nível de expressão de toxina SEC, pela cepa N315, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com *S. aureus*, *L. rhamnosus* e *W. paramesenteroide*, estocados a 7°C. Médias seguidas por letras maiúsculas entre os tempos e pos letras minúsculas entre os tratamentos, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L. rhamnosus*), 315WP (*S. aureus* N315+ *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

Quando analisada a expressão do gene *sec* pela amostra FRI361 (figura 9), observa-se que o tratamento 361 não apresentou diferença ao longo dos 14 dias de análise ($p > 0,05$). Por outro lado, o tratamento 361WP apresentou redução na expressão de *sec* entre os três tempos de análise ($p < 0,05$). Já os tratamentos 361LR e 361WPLR apresentaram diminuição na expressão de *sec* entre os dias 01 e 07 e 01 e 14 ($p < 0,05$); porém sem diferença entre os tempos 07 e 14 de análise ($p > 0,05$).

Em relação ao tempo 01, os tratamentos diferiram entre si ($p < 0,05$), à exceção da expressão de *sec* entre os tratamentos 361LR e 361WPLR. Nesse tempo é interessante observar que o tratamento 361 apresentou menor expressão de *sec* se comparado aos demais tratamentos. Esse comportamento é o oposto ao observado nos queijos que foram inoculados com a amostra N315. Isso pode ter ocorrido pelo fato de a amostra FRI361 ser menos sensível à presença de BAL que a N315. Pois, o que se observa é um aumento da expressão de *sec* pela amostra FRI361 na presença de BAL. Esse aumento pode ser explicado pela possível ativação de mecanismos que

regulam o comportamento de FRI361 diante da competição com outro micro-organismo em um mesmo ambiente. O comportamento dos *S. aureus* utilizados (FRI361 e N315) difere quanto à expressão das suas respectivas toxinas diante da presença de BAL. Isso pode ser sugestivo de que há um comportamento individual de cada amostra, caracterizando uma modulação amostra dependente. Derzelle *et al.* (2009) avaliaram por qPCR a cinética do mRNA de 28 amostras de *S. aureus* enterotoxigênicos, sendo 21 isolados de alimentos envolvidos em surtos alimentares e sete cepas de referência. Eles perceberam que todos os isolados foram capazes de expressar enterotoxinas, entretanto apresentando comportamentos distintos como: indução drástica de expressão no final da fase de crescimento exponencial; inalteração de mRNA's durante o crescimento bacteriano; ligeira diminuição nos níveis de transcrição e aumentos nos níveis de mRNA's no momento pós-exponencial. Os resultados obtidos nesse trabalho podem sugerir uma possível causa para o comportamento cepa-dependente frente à inibição de BAL, também observado no presente trabalho. No dia 07 observa-se que o tratamento 361 apresenta expressão do gene *sec* inferior aos tratamentos 361WP e 361LR ($p < 0,05$). O tratamento 361WP apresenta ainda expressão de *sec* superior à expressão observada no tratamento 361WPLR ($p < 0,05$). No dia 14 percebe-se que os tratamentos 361 e 361WPLR apresentam menor expressão do gene *sec* em relação aos tratamentos 361WP e 361LR ($p < 0,05$). A partir dos resultados obtidos, pode-se deduzir que o tratamento 361WPLR foi mais efetivo para reduzir a expressão da toxina do que os tratamentos.

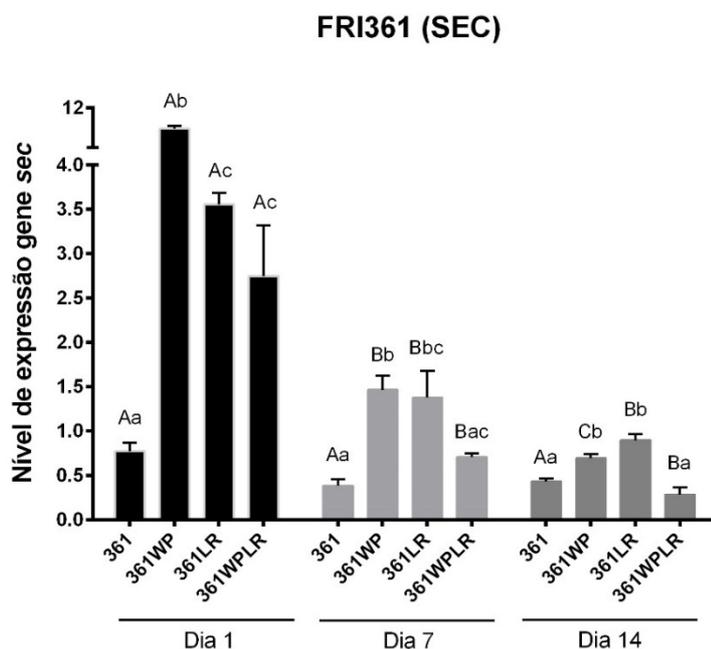


Figura 9: Nível de expressão SEC, pela cepa FRI361, ao longo de 14 dias, em queijos elaborados com *S. aureus*, *L. rhamnosus* e *W. paramesenteroides*, estocados a 7°C. Médias seguidas por letras maiúsculas entre os tempos e por letras minúsculas entre os tratamentos, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Legenda: 01 (controle), 361 (*S. aureus* FRI361), 315 (*S. aureus* N315), 361WP (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides*), 361LR (*S. aureus* FRI361 + *L.*

rhamnosus), 315WP (*S. aureus* N315+ *W. paramesenteroides*), 315LR (*S. aureus* N315 + *L. rhamnosus*), 361WPLR (*S. aureus* FRI361 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*), 315WPLR (*S. aureus* N315 + *W. paramesenteroides* + *L. rhamnosus*)

As BAL são capazes de produzir substâncias com efeito antimicrobiano, como ácidos orgânicos e bacteriocinas, além de proteases que apresentam importância tecnológica na indústria de lácteos (Zhang *et al*, 2014). Dessa forma, é possível pensar que as proteases podem ter uma ação proteolítica sobre toxinas produzidas por *S. aureus*, sendo essa uma possível justificativa para a queda da presença das toxinas estafilocócicas ao longo da estocagem dos queijos.

Na França, resultados semelhantes foram encontrados por Even *et al.* (2009) que avaliaram a expressão de fatores de virulência de *S. aureus* na presença de *Lactococcus lactis*. Eles observaram por reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), que houve uma inibição da expressão de genes reguladores de fatores de virulência, como por exemplo, gene *agr* e *sarA*. Duquenne *et al.* (2010) inocularam *S. aureus* e *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* em queijos e avaliaram a expressão gênica das enterotoxinas A e D por 72h após a elaboração dos queijos.

Nouaille *et al.* (2014) investigaram a interação entre *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *S. aureus* e a capacidade da BAL em regular o sistema *agr* do *S. aureus*. Os autores, por meio de RT-PCR, observaram a redução da expressão do gene *agr* e relacionaram com a redução do pH e com mecanismos de ação do potencial redox, que envolve a eliminação de O₂ pela ação de NADH oxidase, ou ainda pela alteração da cadeia de transporte de elétrons. No Irã, Mohammadi e Hanifian (2014) elaboraram queijos ultrafiltrados com e sem adição de cultura *starter* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e avaliaram a produção de enterotoxina SEA por kit comercial contendo anticorpo monoclonal. Os autores observaram que houve redução na produção da toxina nos queijos, contendo cultura *starter*, ao longo do tempo e atribuem à algum mecanismo inibitório proveniente dos micro-organismos presentes na cultura *starter*.

Outros autores têm utilizado a qPCR para avaliação da expressão de enterotoxinas estafilocócicas sob diversas condições. Na Espanha, Rodríguez *et al.*, (2016) desenvolveram um eficiente método de qPCR capaz de detectar a expressão de enterotoxina estafilocócica em produtos cárneos. Na Suíça, Sihto *et al.* (2016) avaliaram a expressão de enterotoxina D sob estresse causado pela presença de glicose e ácido láctico. Os autores perceberam que tanto a glicose quanto o pH afetaram o crescimento de *S. aureus*, sendo que na presença da glicose a expressão de *sed* caiu na fase estacionária, enquanto que na presença de ácido láctico não houve efeito significativo dessa queda. Em Campinas, Chaves *et al.*, (2018) avaliaram isolados, provenientes de utensílios de cozinha e alimentos, por qPCR com objetivo de detectar expressão de enterotoxinas estafilocócicas. Eles observaram que 20% das amostras testadas (6 de 50) expressaram enterotoxinas, sendo a SED a mais encontrada (50%).

Embora, os trabalhos citados anteriormente tenham utilizado a qPCR como técnica de detecção de expressão de enterotoxinas estafilocócicas, muitos pesquisadores utilizam outras técnicas para identificação de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos ou meios de cultura. Isso ocorre pelo fato das técnicas moleculares apresentarem um alto custo de execução e pela necessidade de mão de obra qualificada para realização da mesma. Sendo assim, na Suíça, Márta *et al.* (2011) avaliaram a produção de SED, por ELISA, em três tipos de presunto: cozido, defumado e curado

à seco; incubados à temperatura ambiente por sete dias. Eles observaram uma contínua expressão da toxina nos presuntos cozido e defumado, sendo que no presunto curado a detecção da toxina ocorreu após cinco dias de incubação. Não obstante, observou-se que as quantidades de SED produzidas nos três presuntos foram suficientes para causar intoxicação estafilocócica a quem os ingerisse.

Na República Tcheca, Valihrach *et al.* (2014) estudaram o crescimento de *S. aureus* e a expressão de genes de enterotoxinas (*sea*, *seg*, *seh*, *sek*, *sel*) e genes reguladores (*sarA*, *saeS*, *codY*, *srrA*, *rot*, *hld*, *agrA*, *sigB*) em meio TSB caldo e em leite. A expressão gênica foi avaliada por qPCR e a presença das enterotoxinas por ELISA. Os autores perceberam que houve maior produção das enterotoxinas no meio TSB do que no leite, e que os genes *sec*, *seh* e *sel* tiveram um comportamento semelhante, ao apresentar um pico de expressão, seguido de uma redução brusca e um aumento posterior. Segundo os autores, isso se deve ao fato do gene *sec* ser regulado pelo gene *agr*, porém mais estudos são necessários para elucidar tal comportamento. No Japão, Fujikawa *et al.* (2017) desenvolveram um método de extração em fase sólida de SEA, utilizando permuta de cátions, em leite e produtos lácteos. A toxina foi detectada principalmente em leite cru, leite em pó desnatado e queijo, demonstrando a eficácia de uma técnica simples e rápida.

As análises moleculares realizadas com as amostras provenientes dos queijos controle (tratamento 01) demonstraram que a contaminação presente nos mesmos não é oriunda das amostras de *S. aureus* utilizadas, pois não houve amplificação dos genes *coa* e *femA* (específicos para *S. aureus*) nas amostras. Além disso, os cDNA's quando avaliados por qPCR também não demonstraram expressão significativa das toxinas estudadas (SEC e TSST-1), confirmando a ausência de *S. aureus* nos queijos provenientes do controle (figuras 10 e 11).

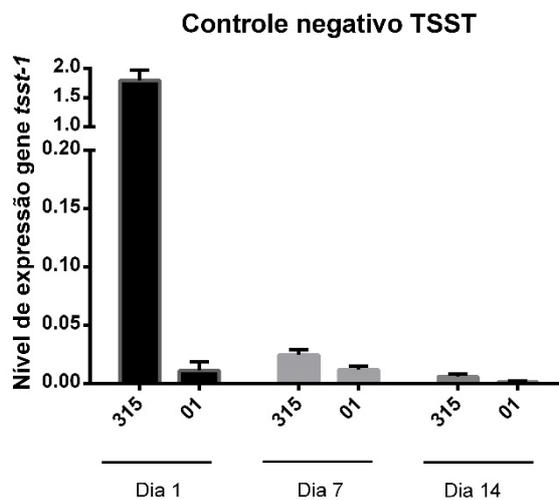


Figura 10: Nível de expressão de toxina TSST-1, pela cepa N315, em queijos não adicionados de micro-organismos (01) e em queijos adicionados apenas de *S. aureus* N315, ao longo de 14 dias de estocagem.

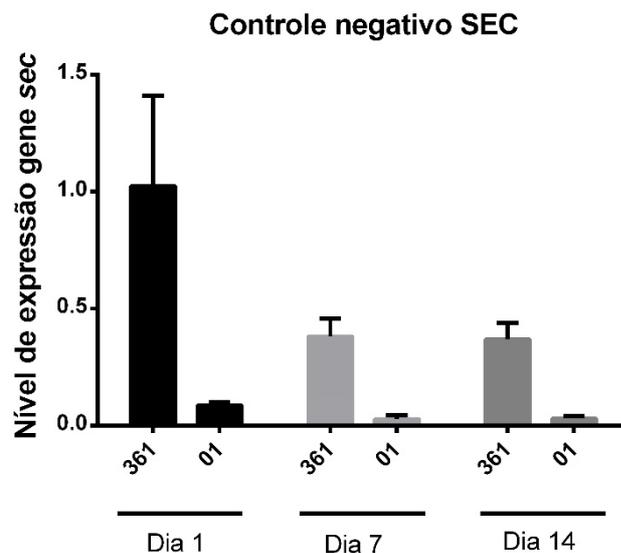


Figura 11: Nível de expressão de toxina SEC, pela cepa FRI361, em queijos não adicionados de micro-organismos (01) e em queijos adicionados apenas de *S. aureus* N315, ao longo de 14 dias de estocagem.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que as amostras de *W. paramesenteroides* (GIR16L4*) e *L. rhamnosus* (D1) utilizadas não são capazes de inibir o crescimento das amostras FRI361 e N315 de *S. aureus* em queijos produzidos em laboratório. Entretanto, esses micro-organismos parecem ser capazes de atuar na modulação da expressão de toxinas estafilocócicas em um mecanismo cepa-dependente ou alternativamente influenciar na estabilidade das toxinas ao longo da estocagem. Estudos que verifiquem quais os mecanismos de BAL são capazes de atuar na diminuição da expressão das toxinas estafilocócicas ao longo da estocagem de queijos são necessários para elucidar a interação entre esses micro-organismos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, E.A.M.; SOHER, E.A.; SALEH, Y.; MARY, S.; AMAL, S.H. Probiotic bacteria as a tool to produce high quality and safe Ras cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v. 36, n. 1, p.97-109, 2008.
- ACUÑA, L.; PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R. D.; BELLOMIO, A. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Federation of European Biochemical Societies*, n. 2, p. 12-19, 2012.
- ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 5, p. 629-632, 1998.
- AL-DELAIFY, K.S.; HAMAMDEH, Y.M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria and/or *Bifidobacterium lactis* during milk fermentation and storage. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 2, n. 4, p. 2406-2419, 2013.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- ALLOS, B. M.; MOORE, M. R.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the foodnet perspective. *Clinical Infectious Disease*, Clifton, v. 38, suppl. 03, p. S115-S120, 2004.
- ALMEIDA, L.M. Fatores de virulência e genes regulatórios agr de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastitis bovina e ovina. 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALMEIDA, P.M.P.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.
- ALOMAR, J.; LOUBIERE, P.; DELBES, C.; NOUAILLE, S.; MONTEL, M.C. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology*, v. 25, p. 502-508, 2008.
- ANDRADE, C. R. G. *Propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra –MG*. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- ANDREWS, W. H., R. S. FLOWERS, J. SILLIKER, AND J. S. BAILEY. 2001. *Salmonella*. Pages 357–376 in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. F. P. Downes and K. Ito, ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC.
- ANDREY, D.O. *Molecular regulation of tsst superantigen expression by global regulatory systems in Staphylococcus aureus*. 2011. 120p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidad de Genebra, Genebra, 2011.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. v. 2, p. 1751–73, 2010.

ARQUÉS, J.L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; GUAMIS, B.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 254-260, 2005.

ASSIS, B.S. *Efeito de Lactobacillus rhamnosus e de Lactococcus lactis isolados de queijo de coalho na viabilidade e produção de enterotoxina B por Staphylococcus aureus FRI-S6 em queijo*. 2010. 55p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BECKER, K.; HAVERKAMPER, C.; VON EIFF, C.; ROTH, R.; PETERS, G. Survey of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-*Staphylococcus aureus* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, v. 20, p. 407 – 409, 2001.

BENNETT, R.W. *Staphylococcal* enterotoxin and its rapid identification in foods by enzymelinked immunosorbent assay-based methodology. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 6, p. 1264-1270, 2005.

BENNETT, S.D.; WALSH, K.A.; GOULD, L.H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* – United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Disease*, v.57, n.3, p.425-433, 2013.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v.11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcal* food poisoning. In: RIEMMAN, H.; CLIVER, D. O. (Eds.). *Foodborne infections and intoxications*. New York: Academic Press, 1990. p. 85-106.

BERGDOLL, M.S., ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. *Journal of Milk and Food Technology*, v. 36, p. 610–612, 1973.

BOGDANOVICOVA, K.; NECIDOVA, L.; HARUSTIAKOVA, D.; JANSTOVA, B. Milk powder risk assessment with *Staphylococcus aureus* toxigenic strains. *Food Control*, v. 73, p. 2-7, 2017.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *Boletim CEPPA*, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

BRASIL, Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996a - Aprova a extensão de uso da Nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5mg/kg. Consultado em 01/09/2015
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b4524d8049025fd396fa9f05df47c43c/Comp%C3%AAndio++JUNHO+2015_em+atualiza%C3%A7%C3%A3o2.pdf?MOD=AJPERES. 1996a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 11/03/1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*. Brasília, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>. (acesso em 04 de setembro de 2017).

BRETT, G.M.; CHAMBERS, S.J.; HUANG, L.; MORGAN, M.R.A. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, v. 10, n. 6, p.401-406, 1999.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, v.28, p. 183-200, 2004.

BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1993.

BYCZKOWSKI, J.Z.; GESSNER, T. Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, v. 20, n. 6, p. 569-580, 1988.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food Poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* presente in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M. A case study of a massive *Staphylococcal* food poisoning incidente. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.01, n. 04, p. 241-246, 2004.

CARNIELLO, R.S., SILVA, R.F., FIORINI, A. Descontaminação de resíduos de brometo de etídeo gerados em procedimentos de biologia molecular. *IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar*. Maringá, out. 2008.

CARVALHO, S.A.; CARMO, L.S.; ABREU, E.F.; DIAS, R.S.; APOLÔNIO, A.C.M.; SANTOS, S.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. TSST-1, enterotoxin and bacteriocin-like substance production by *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 5, p. 1537-1544, 2013.

CHARLIER, C.; EVEN, S.; GAUTIER, M.; LE LOIR, Y. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 197-203, 2008.

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

CHAVES, R.D.; PRADELLA, F.; TURATTI, M.A.; AMARO, E. C.; SILVA, A. R.; FARIAS, A.S.; PEREIRA, J.L.; KHANEGHAH, A.M. Evaluation of *Staphylococcus* spp. in food and kitchen premises of Campinas, Brazil. *Food Control*, v. 84, p. 463-470, 2018.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Acesso em 27/04/2017.

COSTA, H. H. S. *Potencial probiótico de Lactobacillus spp. e Weissella paramesenteroides isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

COSTA, H., SOUZA, M., ACÚRCIO, L., CUNHA, A., RESENDE, M., NUNES, A. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, p. 1858-1866, 2013.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p.777-788, 2005.

CRUZ, E.D.A. *Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus resistente à meticilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde*. 2008. 189p. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection os enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p. 70-74, 2006.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. *Microbiology and Immunology*, v. 51, n.04, p. 381-390, 2007.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DABIZA, N. M. A.; EL-DEIB, K. Biochemical evaluation and microbial quality of Ras cheese supplemented with probiotic strains. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, v. 57, n. 3, p. 295-300, 2007.

DABUL, A.N.G. *Estudo epidemiológico molecular de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta GraR*. 2014. 136p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

- DELBES-PAUS, C.; DORCHIES, G.; CHAABNA, Z.; CALLON, C.; MONTEL, M.C. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiology*, v. 27, p. 924-932, 2010
- DELBONI, R. R. *Dinâmica populacional de microrganismos e a conservação de alimentos*. 143p. 2009. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2009.
- DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology*, v. 26, n. p. 896-904, 2009.
- DIMITRIEVA-MOATS, G.Y.; ÜNLÜ. Development of freeze-dried bacteriocincontaining preparations from lactic acid bacteria to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 4, p. 27-38, 2012.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.
- DUQUENNE, M.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; BOREZÉE-DURANT, E.; DERZELLE, S.; BOUIX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. Tool for quantification of Staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 05, p. 1367-1374, 2010.
- EIJSINK, V.G.H.; AXELSSON, L.; DIEP, D.B.; HÅVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I.F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n.1, p.639-654, 2002.
- EVEN, S.; CHARLIER, C.; NOUAILLE, S.; ZAKOUR, N.L.B.; CRETENET, M.; COUSIN, F.J.; GAUTIER, M.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LOUBIÈRE, P.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 13, p. 4459-4472, 2009.
- FETSCH, A.; CONTZEN, M.; HARTELT, K.; KLEISER, A.; MAASSEN, S.; RAU, J.; KRAUSHAAR, B.; LAYER, F.; STROMMENGER, B. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *International Journal of Food Microbiology*, v. 187, p. 1-6, 2014.
- FIL-IDF, 1982. Cheese and processed cheese: Determination of total solids content. In: International Dairy Federation Standard 4A. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FIL-IDF, 1993. Milk: Determination of nitrogen content. In: International Dairy Federation Standard 20B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 607p. 2013.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 182 p.

- FREITAS, E.I. *Deteção de genes de enterotoxinas de Staphylococcus spp. isolados de queijo Minas frescal*. 2005. 119p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.
- FUJIKAWA, H.; HIRAYAMA, W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin. *Food Control*, v. 73, p. 720-725, 2017.
- FUNED - Fundação Ezequiel Dias. Protocolos: I) Produção de toxinas estafilocócicas pelo método de membrana sobre ágar. II) Extração de toxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED E TSST1), a partir do alimento, para detecção pelo método OSP. 2015.
- GORDON, D.M.; OLIVER, E.; LITTLEFIELD-WYER, J. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley, M.; Chavan, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin Springer; p. 5-18, 2007.
- GORWITZ, R.J.; JERNIGAN, D.B.; POWERS, J.H.; JERNIGAN, J.A. Strategies for clinical management of MRSA in the community: summary and an expert's meeting convened by the Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca.html Acesso em 22 setembro 2017.
- GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.
- GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; ERLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 82, n. 1-4, p. 187-216, 2002.
- GÜCÜKOĞLU, A.; ÇADIRCI, Ö.; TERZI, G.; KEVENK, T.O.; ALISARLI, M. Determination of enterotoxigenic and methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in ice cream. *Journal of Food Science*, v. 78, n. 5, p. 738-741, 2013.
- GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005.
- GUIMARÃES, G.; FRANÇA, C.A.F.; KRUG, F.S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1219-1224, 2012.
- GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; FIGUEIREDO, J.C.; PANTOJA; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 05, p. 1-6, 2013.
- HAIT, J.; TALLENT, S.; MELKA, D.; KEYS, C.; BENNETT, R. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, p. 866-875, 2014.

- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Methods*, v.6, p. 986-994, 1996.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*, v. 11, 1993.
- HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, p. 2286–2290, 2005.
- HENG, N.; WESCOMBE, P.; BURTON, J.; JACK, R.; TAGG, J. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley, M.; Chavan, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin, Springer: p. 45-92, 2007.
- HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, p. 815-836, 2012.
- HERRERA, E.A.C.; Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla –Colombia. 15 y 16 de septiembre de 2006.
- HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal Clinical Nutrition*, v. 73, n. 2, p. 365-373, 2001.
- HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, n. 3, p. 343-362, 1995.
- HUSE, S.M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; RELMAN, D.A.; SOGIN, M.L. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRna Hypervariable Tag Sequencing. *Plos Genetics*, v.04, n.11, p. 01-10, 2008.
- HOR, Y.Y.; LIONG, M.T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sinica*, v. 32, p. 141-147, 2014.
- IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A e H. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n.5, p. 2793-2795, 2005.
- IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. *Staphylococcal* cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *Journal of Dermatological Science*, v. 42, p. 203-214, 2006.
- JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 2, p.631-641,2002.

- JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JERONYMO, A.B.O. *Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala*. 2013. 108p. Dissertação (Mestre em Microbiologia), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Jose do Rio Preto, 2013.
- JØRGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters*, v. 252, p. 267-272, 2005.
- JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, esfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 03, p. 426-430, 1991.
- KENNY, K.; REISER, R.F.; BASTIDA-CORCUERA, F.D.; NORCROSS, N.L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n.03, p.706-707, 1993.
- KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 10, p. 4683- 4687, 2003.
- KONEMAM, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN-JUNIOR, W.C. *Diagnóstico Microbiológico*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001, 1465p.
- KORNACKI, J. L., AND J. L. JOHNSON. 2001. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. Pages 69–80 in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. F. P. Downes and K. Ito, ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERGG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 95-124, 2006.
- LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus* In: DOWNES, F.R; KEITH, I.T.O. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. p.387403.
- LEITE, M. M.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo frescal. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n. 132, p. 89-93. 2005.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LE MARC, Y.; VALÍK, L.; MEDVED’OVÁ, A. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, p. 306-311, 2009.

LIMA, D.M. *Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do Mycobacterium tuberculosis em pacientes com suspeita de tuberculose pleural*. 2001. 117p. Dissertação (Mestre em Biociências Aplicadas à Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LORA, P.S., *Comparação do desempenho diagnóstico de diferentes métodos de detecção de anticorpos anti-ENA em pacientes com suspeita de doença difusa do tecido conjuntivo*. 2009. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

LOVEDAY, H.P.; PELLOWE, C. M.; JONES, S. R.; PRATT, R. J. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (Subgroup A). *Journal of Hospital Infection*, v.63, suppl. 1, p. S45-S70, 2006.

MARTIN, J.G.P. *Biofilmes de Staphylococcus aureus isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal*. 2015. 103p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

MacFADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2ed. Baltimore: Willians e Wilkins, 1980. 527p.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, p. 39-48, 2003.

MÁRTA, D.; WALLIN-CARLQUIST, N.; SCHELIN, J.; BORCH, E.; RADSTROM, P. Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food Microbiology*, v. 28, p. 617-620.

MARTINS, A.D.O.; MENDONÇA, R.C.S.; SILVA, D.L.; RAMOS, M.S.; MARTINS, M.C.; DONZELE, J.L.; ANDRADE, N.J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.

MATTOS, E.C. *Caracterização genotípica de cepas de Staphylococcus aureus recuperadas de alimentos, mão de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas*. 2005. 74p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MAYO, B., SINDEREN, V.D., VENTURA, M. Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Current Genentics*, v. 9, p. 169-183, 2008.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JONHSON, W. M.; Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methiciliin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 03, p. 1032-1035, 2000.

MIWA, N.; KAWAMURA, A.; MASUDA, T.; AKIYAMA, M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 361-366, 2001.

MOHAMMADI, K.; HANIFIAN, S. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in Iranian ultra-filtered white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, v. 68, n. 01, p. 111-117, 2014.

MORENO, I.; LERAYER, A. L.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

MORGANTE, C.V.; BLAWID, R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. EMBRAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. ISSN 1808-9992, 2016.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of clinical microbiology*. 7ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 325-337.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NEAL, C.E.; CALBERT, H.E.; The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *Journal of Food Protection*, v. 38, n. 6, p. 629-633, 1955.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D.V.; GOEL, A.K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *International Journal of Food Microbiology*, v.117, p. 29-35, 2007.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 70, n. 2-4, p.113-128, 1996.

NOUAILLE, S.; RAULT, L.; JEANSON, S.; LOUBIÈRE, P.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the agr system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 22, p. 7028-7035, 2014.

OLIVEIRA, C.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P.; SILVA, J.A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 07, n. 01, p. 01-07, 2012.

OLIVEIRA, D.L.S. *Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista in vitro frente a Lactobacillus spp.* 2012. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

OLIVEIRA, G. A.; OKADA, S.S.; GUENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 37, n. 4, p. 239-46, 2001.

- O'NEIL, E., POZZI, C., HOUSTON, P., SMYTH, D., HUMPHREYS, H., ROBINSON, D.A., O'GARA, J.P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1379-88, 2007.
- OSTYN, A.; BUYSER, M.L.; GUILLIER, F.; GROULT, J.; FÉLIX, B.; SALAH, S.; DELMAS, G.; HENNEKINNE, J.A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(13):pii=19528. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle>.
- OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial Components from Acid Lactic Bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria –Microbiological and Functional Aspects*. 3ed, New York: Marcel Dekker, 628p. 2004.
- PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R.M.; AYERS, T.; TAUXE, R.V.; BRADEN, C.R.; ANGULO, F.J.; GRIFFIN, P.M. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.3, p. 407-415, 2013.
- PAINTER, K.L.; KRISHNA, A.; WGNESHWERARAJ, S.; EDWARDS, A.M. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 12, 2014.
- PAIXÃO, D.A.A. *Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel*. 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- PARADA, J.L.; CARON, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.50, n.3, p.521-542, 2007.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*, v. 26, p. 278-282, 2009.
- PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1.Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, v. 71, p. 525-541, 1991.
- PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S. *et al.* Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, v. 163, p.34-40, 2013
- RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES JUNIOR, A.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G.; ARAÚJO JUNIOR, J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, v. 132, p. 408-413, 2008.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 117-137, 2002.

RODRÍGUEZ, A.; GORDILLO, R.; ANDRADE, M.J.; CÓRDOBA, J.J.; RODRÍGUEZ, M. Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products. *Food Control*, v. 60, p. 302-308, 2016.

RODRIGUES, G. R. *Prospecção de genes de celulase presentes em biblioteca metagenômica*. 2008. 52p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

ROSA, M. C.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Conscientiae Saúde Revista Científica*, v. 1, p.09-15, 2002.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

ROSS, R.P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A.; Novels cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology*, v. 11, n. 3, p.96-104, 2000.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; TAMANINI, R.; SILVA, W.P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina A, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. *Semana: Ciências Agrárias*, v. 27, n.4, p. 639-646, 2006.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SANTILIANO, F., C.; ALEMIDA, B.,R.; IGNACCHITI, M.,D.,C.; JUNIOR, O., S., P. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. *Pubvet*, v. 5, N. 3, art. 1009, 2011.

SANTOS, F.G.P. *Estudo epidemiológico-molecular e de fatores de virulência de Staphylococcus aureus associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos Estados de São Paulo e Pernambuco*. 2009. 121p. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

SARIKA, A.R.; LIPTON, A.P.; AISHWARYZ, M. S. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, v. 2, n. 5, p. 291-297, 2010.

SASAKI, T.; TERANO, Y.; SHIBATA, T., KAUAMOTO, H.; KUZUGUCHI, T.; KOYAMA, E. Establishment of highly specific and quantitative immunoassay systems for staphylococcal enterotoxin A, B and C using newly-developed monoclonal antibodies. *Microbiology and Immunology*, v. 49, p. 589-597. 2005.

SCHLIEVERT, P.M.; JABLONSKI, L.M.; ROGGIANI, M.; SADLER, I.; CALLANTINE, S.; MITCHELL, D.T.; OHLENDORF, D.H.; BOHACH, G.A. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infection and Immunity*, v.68, n.06, p.3630-3634, 2000.

SCHUENK, R.P. *Staphylococcus aureus* isolados de próteses articulares e outras infecções: diversidade: genotípica e aspectos relacionados à resistência e virulência. 2009, 148p. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SERIDAN, B.A.; SOUZA, M.R.; NICOLI, J.R.; CARMO, L.S.; MENEZES, L.D.M.; OLIVEIRA, D.L.S.; ANDRADE, E.H.P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI-S6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 2, p. 465-470, 2012

SILVA, G.O. Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo. 2013, 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVA, R. S. Caracterização da microbiota da glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente probióticas isoladas desse ecossistema. PhD Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2016

SINGH, D.V.; MATTE, M.H.; MATTE, G.R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, B.N.; SANYAL, S.C.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, non-O139 strains: clonal relationships between clinica and environmental isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 910-921, 2001.

SIHTO, H.; TASARA, T.; STEPHAN, R.; JOHLER, S. Growth behavior and temporal enterotoxina D expression of *Staphylococcus aureus* strains under glucose and lactic acid stress. *Food Control*, v. 62, p.69-73, 2016.

SIKORSKA, H.; SMORAGIEWICZ, W. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v, 42, p. 475-481, 2013.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. *Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer*, v.8, n.14, p.14-19, 2012.

SORIANO, J.M., FONT, G., MOLTÓ, J. C., MAÑES, J. *Trends in Food Science & Technology*, v.13, p. 60-67, 2002.

SOSPEDRA, I.; MAÑES, J.; SORIANO, J.M. Reporto f toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservice establishments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 80, p. 288-290, 2012.

SOUZA, A.C.M.F. *Comparação das técnicas de PCR em tempo real e PCR para o estudo dos genes MYCN, DDX1 e NAG em pacientes portadores de neuroblastoma*. 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection*, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.

TAGG, J. R.; DAJAMI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2002.

TEVA, A., FERNANDEZ, J.C.C, SILVA, V.L. Imunologia. In: *Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz. 2010, cap.1 p. 92-98.

TRINDADE, P. A.; McCULLOCH, J. A.; OLIVEIRA, G. A.; MAMIKUZA, E.M. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v. 7, n. 1, p. 32-43, 2003.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M.L. Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Advances in Applied Microbiology*, v. 62, p. 191-234, 2007.

ULVE, V.M.; MONNET, C.; VALENCE, F.; FAUQUANT, J.; FALENTIN, H.; LORTAL, S. RNA extraction from cheese for analysis of *in situ* gene expression of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 1327-1333, 2008.

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

VALLE, J.; VADILLO, S.; PIRIZ, S.; GOMEZ-LUCIA, E. Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by Staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.03, p. 889-891, 1991.

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de substâncias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, v. 36, n.1, p.64-71, 2009.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Pública de México*, v. 47, p. 381-7, 2005.

YONG, C.; KHOO, B.; SASIDHARAN, S.; PIYAWATTANAMETRHA, W.; KIM, S.; KHEMTHONGEHAROEN, N.; CHUAH, L.; ANG, M.; LIONG, M. Activity of crude and fractioned extracts by lactic acid bacteria (LAB) isolated from local dairy, meat, and fermented products against *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*, v. 65, p. 1037-1047, 2015.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GOTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 127, p. 246-251, 2008.

ZHANG, S.; ZHANG, L.; JIAO, Y.; LUO, X.; LI, H.; XIN, L.; XUE, C.; ZHANG, Y.; YI, H.; HAN, X.; MA, C. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Protease Isolated From Traditional Chinese Fermented Milk. *Journal of Food Quality*, v.37, p. 395-402, 2014.