



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE  
PÚBLICA NOS TRÓPICOS (PPGSaspt)

**ÉZIO MACHADO RODRIGUES**

**POTENCIAL TOXIGÊNICO, DETERIORANTE E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE  
POSITIVA ISOLADAS EM QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL  
COMERCIALIZADOS NO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS**

ARAGUAÍNA – TO

2022

**ÉZIO MACHADO RODRIGUES**

**POTENCIAL TOXIGÊNICO, DETERIORANTE E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE  
POSITIVA ISOLADOS EM QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL  
COMERCIALIZADOS NO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins – UFT, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientador: Prof.º Dr.º José Carlos Ribeiro Junior

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Bruna Alexandrino

ARAGUAÍNA – TO

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

R696p Rodrigues, Ézio Machado .  
POTENCIAL TOXIGÊNICO, DETERIORANTE E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus COAGULASE*  
POSITIVA ISOLADOS EM QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL  
COMERCIALIZADOS NO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS. / Ézio  
Machado Rodrigues. – Araguaína, TO, 2022.  
45 f.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins  
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)  
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2022.  
Orientador: José Carlos Ribeiro Júnior  
Coorientadora : Bruna Alexandrino  
1. Enterotoxinas estafilocócicas. 2. Intoxicação alimentar. 3. *S. aureus*. 4.  
Microbiologia de alimentos. I. Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

ÉZIO MACHADO RODRIGUES

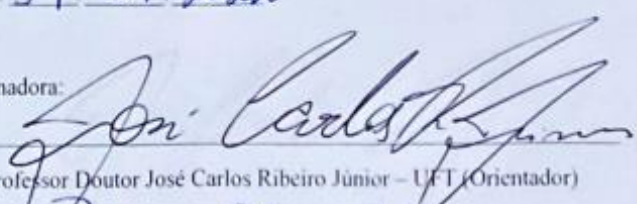
POTENCIAL TOXIGÊNICO, DETERIORANTE E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA  
ISOLADAS EM QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NO  
NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS

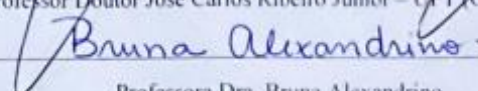
FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) como requisito para obtenção do Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca examinadora.

Aprovada em: 14/04/2022

Banca Examinadora:

  
Professor Doutor José Carlos Ribeiro Júnior – UFT (Orientador)

  
Professora Dra. Bruna Alexandrino

  
Professora Dra. Cátia Maria de Oliveira Lobo

## RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) implicam diretamente na saúde pública. Podem ter etiologia bacteriana, na qual o patógeno *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos relacionados a surtos de DTA no Brasil. Os produtos clandestinos, nesse contexto, apresentam maior risco à saúde pública por não terem sido submetido a qualquer tipo de fiscalização sanitária desde a matéria-prima até a sua comercialização podendo conter patógenos potencialmente capazes de causar doenças aos consumidores. Considerando a falta de conhecimento sobre os perigos microbiológicos dos principais alimentos causadores de doenças alimentares existente na região norte do Tocantins; no impacto das DTA's na saúde pública; no levantamento de informações técnicas sobre a efetividade dos princípios ativos antimicrobianos frente aos patógenos alimentares; e na falta de embasamento teórico-científico para elaboração de programas profiláticos específicos de controle e vigilância epidemiológica e sanitária do risco de ocorrência de perigos dos alimentos de origem animal informalmente comercializados no norte do estado do Tocantins, o presente trabalho teve como objetivo identificar em queijos tipo minas frescal clandestinos, espécies de estafilococos coagulase positiva (ECP) por meio de provas bioquímicas como a capacidade de hemólise, produção de acetoina e fermentação de açúcares; avaliar seu potencial enterotoxigênico, por abordagem molecular; e o potencial deteriorante em diferentes condições de temperatura; assim como a sua susceptibilidade antimicrobiana através da técnica de difusão em disco. Foram avaliadas 21 amostras de queijos comercializadas informalmente no norte do estado do Tocantins. Da totalidade de 355 isolados ECP, 177 (49,86%) foram identificados como *S. aureus*, 2 (0.56%) *S. intermedius*, 3 (0.84%) *S. hycus*, 2 (0.56%) *S. delphini*, e 1 (0.28%) *S. coagulans*. Do total de 173 isolados de *S. aureus*, 25 (52,08%) foram positivos para o gene *tst*, que codifica a síntese da toxina de choque tóxico. Outros 16 (33,33%) foram positivos para o gene *sea*, assim como quatro (8,33%) foram positivos *see*, e um isolado positivo para cada um dos genes *seb* (2,08%), *sec* (2,08%) e *etb* (2,08%). Todos os isolados demonstraram atividade lipolítica em condição mesófila e psicrotrófica sendo que as espécies *S. intermedius* e *S. hycus* obtiveram destaque em relação à atividade proteolítica. Em relação a sensibilidade antimicrobiana, foi observado multirresistência na maioria dos isolados, sendo a clindamicina o princípio ativo com menor eficiência (40%), já o grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomina) foi o grupo com maior eficiência, sendo capaz de inibir de forma satisfatória todos os isolados avaliados. Conclui-se que os queijos tipo minas frescal, comercializados na região norte do estado do Tocantins, podem apresentar uma curta vida útil devido a atividade deteriorante dos isolados avaliados, assim como os queijos avaliados podem oferecer risco aos consumidores, já que apresentavam elevadas contagens de ECP e foram isoladas cepas com potencial toxigênico.

**Palavras chaves:** Enterotoxinas estafilocócicas, Intoxicação, *S. aureus*, PCR, Queijo.

## ABSTRACT

Foodborne diseases (DTA's) directly affect public health. They may have a bacterial etiology, in which the pathogen *Staphylococcus aureus* is one of the main etiological agents related to outbreaks of DTA in Brazil. Clandestine products, in this context, present a greater risk to public health because they have not been subjected to any type of sanitary inspection from the raw material to its commercialization, and may contain pathogens potentially capable of causing diseases to consumers. Considering the lack of knowledge about the microbiological hazards of the main foods that cause foodborne diseases in the northern region of Tocantins; on the impact of ATDs on public health; in the collection of technical information on the effectiveness of antimicrobial active principles against food pathogens; and in the lack of theoretical-scientific basis for the elaboration of specific prophylactic programs of control and epidemiological and sanitary surveillance of the risk of occurrence of dangers of foods of animal origin informally commercialized in the north of the state of Tocantins, the present work had as objective to identify in cheeses clandestine fresh mines, coagulase-positive staphylococci species (ECP) through biochemical tests such as the ability to hemolysis, acetoin production and sugar fermentation; to evaluate its enterotoxigenic potential, by molecular approach; and the deteriorating potential under different temperature conditions; as well as its antimicrobial susceptibility through the disk diffusion technique. Twenty-one samples of cheese commercialized informally in the north of the state of Tocantins were evaluated. Of the total of 355 ECP isolates, 177 (49.86%) were identified as *S. aureus*, 2 (0.56%) *S. intermedius*, 3 (0.84%) *S. hycus*, 2 (0.56%) *S. delphini*, and 1 (0.28%) *S. coagulans*. Of the 173 isolates of *S. aureus*, 25 (52.08%) were positive for the *tst* gene, which encodes the synthesis of toxic shock toxin. Another 16 (33.33%) were positive for the *sea* gene, as well as four (8.33%) were positive for *see*, and one isolate was positive for each of the *seb* genes (2.08%), *sec* (2.08 %) and *etb* (2.08%). All isolates showed lipolytic activity in mesophilic and psychrotrophic conditions, with *S. intermedius* and *S. hycus* being highlighted in relation to proteolytic activity. Regarding antimicrobial sensitivity, multidrug resistance was observed in most of the isolates, with clindamycin being the active ingredient with the lowest efficiency (40%), on the other hand, the group of aminoglycosides (gentamicin and streptomycin) was the group with the highest efficiency, being able to inhibit from satisfactorily all the isolates evaluated. It is concluded that the Minas Frescal cheeses, marketed in the northern region of the state of Tocantins, may have a short shelf life due to the deteriorating activity of the evaluated isolates, as well as the evaluated cheeses may pose a risk to consumers, since they presented high counts of ECP and strains with toxigenic potential were isolated.

**Keywords:** Cheese, PCR, Poisoning, *S. aureus*, Staphylococcal Enterotoxins.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Interpretação do método simplificado de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva conforme Costa et al. (2010).....29
- Tabela 2** – Genes que codificam a produção de toxinas estafilocócicas, *primers*, produtos esperados e condições de amplificação individual de cada ensaio multiplex conforme Mehrotra et al. (2000) e modificações otimizadas.....29
- Tabela 3** – Identificação bioquímica de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de 21 amostras de queijos tipo Minas Frescal clandestinos comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.....32
- Tabela 4** – Potencial proteolítico e/ou lipolítico de espécies de *Staphylococcus* isolados de queijos tipo Minas Frescal Clandestinos comercializados clandestinamente em Araguaína, Tocantins, de abril a junho de 2019.....34
- Tabela 5** – Potencial genético de síntese de produção de toxinas estafilocócicas de isolados de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de 21 amostras de queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma clandestina em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.....35
- Tabela 6** – Resistência antimicrobiana de *S. aureus* com potencial genético de produção de toxinas isolados a partir amostras de queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma clandestina em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.....36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA – Califórnia

CPI – Ciprofloxacina

CLI – Clindamicina

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfato

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

ECP – Estafilococos coagulase positiva

EE – Enterotoxinas estafilocócicas

ENO - Enrofloxacin

ERI – Eritromicina

EST - Estreptomicina

GEN – Gentamicina

ISO – Organização internacional de padronização

LabMA – Laboratório de microbiologia de alimentos

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização mundial da Saúde.

PBP – Proteína ligadora de penicilina

PBP<sub>a</sub> – Proteína ligadora de penicilina alterada

PCA – Plate Count Ágar

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PT – Toxinas pirogênicas

QMF – Queijo Minas Frescal

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUT - Sulfazotrim

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde



TET – Tetraciclina

TRI – Trimetoprim

UFC – Unidade formadora de colônia

USA – Estados Unidos da América

UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins

VP – Voges-Proskauer

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos:.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>CAPÍTULO I .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>3.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTAs) .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>3.3 Intoxicação estafilocócica.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3.4 Resistência a antibióticos .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3.5 Utilização de PCR para identificação de <i>S. aureus</i> e genes associados à<br/>produção de enterotoxinas .....</b> | <b>16</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4 ARTIGO .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>CAPÍTULO III .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>44</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são provocadas por agentes que se instalam no organismo hospedeiro, muitas vezes em decorrência da ingestão de água ou alimentos contaminados (BRASIL, 2010). Tais agentes podem ser de natureza química, como agrotóxicos, ou biológicos, como micro-organismos causadores de doenças (SILVA; BERGAMINI; OLIVEIRA, 2010).

Entre os anos 2000 e 2017 ocorreram 12.503 surtos de DTA em todo o Brasil, nos quais 2.340.201 pessoas foram expostas e destas 236.403 ficaram doentes, o que acarretou 182 óbitos. Contudo, esse número de casos pode ser consideravelmente maior, já que, segundo Forsythe (2000), os casos de DTAs são subnotificados.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), no período compreendido entre os anos 2000 a 2017, os alimentos de origem animal foram discriminados como alimentos desencadeadores em 17,51% dos surtos notificados de DTAs (BRASIL, 2018). Isso pode ser decorrente de falhas na manipulação desses alimentos nas diversas etapas de produção, nas quais a falta ou falha de medidas higiênico-sanitárias eficientes, associada com o fato de boa parte da microbiota patogênica ser proveniente dos próprios animais, tornam esses alimentos muito propensos a oferecer perigo microbiológico ao consumidor (FORSYTHE, 2000).

O comércio informal de alimentos, sem inspeção sanitária, configura risco à saúde pública uma vez que esse tipo de comercialização permite que os produtos sejam facilmente contaminados por micro-organismos patogênicos, devido às condições inadequadas do local de preparo e à falta de conhecimento sobre técnicas higiênicas ou sanitárias de preparo e manipulação por parte dos comerciantes (RODRIGUES et al., 2003).

Segundo o último levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde, publicado em 2018, as bactérias estão relacionadas como agentes etiológicos em mais de 90% dos casos de DTAs (BRASIL, 2018). As intervenções médicas nos casos de DTAs de origem bacteriana se baseiam principalmente no uso de antibioticoterapia, sendo assim torna-se necessária a avaliação de princípios ativos mais eficientes e o monitoramento da disseminação de linhagens bacterianas multirresistentes (BRASIL, 2010).

O perfil epidemiológico das DTAs no Brasil ainda é pouco conhecido e carente de informações (MALACRIDA; DIAS; LIMA, 2017; MELO et al., 2018). Apenas algumas regiões, estados e/ou municípios dispõem de pesquisas e dados a cerca dos agentes etiológicos de DTAs mais comuns, alimentos frequentemente envolvidos e fatores contribuintes para os surtos (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Chin (2002) destaca que para um controle eficiente de doenças transmissíveis, dados epidemiológicos confiáveis a respeito da prevalência, distribuição e etiologia, configuram um componente essencial de qualquer sistema de investigação em saúde pública. Esses estudos estruturam ações estratégicas para mitigação de risco.

Considerando, portanto, o grande impacto que as doenças transmitidas por alimentos têm na saúde pública; na falta de estudos e dados epidemiológicos necessários para ações de vigilância epidemiológica e sanitária; e, na importância de investigar fatores higiênico-sanitários, microbiológicos e antimicrobianos, esse trabalho teve por objetivo subsidiar ações médicas e epidemiológicas a partir da caracterização de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo Minas Frescal informalmente comercializados no norte do estado do Tocantins.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Determinar as espécies, o potencial toxigênico e deteriorante de cepas de estafilococos coagulase positiva e a susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isoladas de queijo minas frescal informalmente comercializados no norte do estado do Tocantins.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar as espécies de estafilococos coagulase positiva com base nas características morfotintoriais e provas bioquímicas contidas em amostras de queijo tipo Minas Frescal informalmente comercializados;
- Pesquisar genes de produção de enterotoxinas dos estafilococos coagulase positiva por abordagem molecular;
- Verificar o potencial proteolítico e lipolítico dos estafilococos coagulase positiva em diferentes condições de armazenamento; e,
- Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* a diversos tipos de antibióticos.

## CAPÍTULO I

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTAs)

As contaminações de alimentos por micro-organismos podem ocorrer ao longo das diversas etapas de produção, desde a elaboração até a comercialização desses, e configuram um grande problema de saúde pública mundial, visto que anualmente, milhões de pessoas ao redor do mundo são acometidas por DTAs (MELO et al., 2018).

As DTAs estão associadas a síndrome com sinais clínicos de perturbação do trato digestivo, que pode ser influenciada pelo agente etiológico ou toxina responsável, quantidade do alimento ingerido e susceptibilidade do indivíduo acometido (CÂMARA; MELO, 2015). Contudo, outros sistemas e órgãos, a depender do agente etiológico, podem ser acometidos pelas DTAs, como o sistema nervoso central, rins, meninges e fígado (BRASIL, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como DTA as enfermidades de cunho infeccioso ou tóxico causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes físicos, químicos e biológicos (BRASIL, 2010). O grupo de DTAs é constituído por volta de 250 tipos de doenças alimentares, que gera, entre outros fatores, perdas econômicas expressivas, em virtude dos gastos gerados com o tratamento das pessoas acometidas, prejuízos no turismo e na sociedade (OLIVEIRA et al. 2010).

Segundo um estudo de perfil epidemiológico, feito com base nos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, entre os anos 2000 e 2017, os alimentos de origem animal estão mais relacionados com surtos alimentares no país (BRASIL, 2018).

As bactérias estão comumente relacionadas aos casos de DTAs. Seu grau variado de virulência e sua ampla diversidade confere a esses micro-organismos grande importância frente a sua capacidade de gerar danos à saúde coletiva (SILVA, 2017). No Brasil, nos últimos 17 anos as bactérias foram responsáveis por 92,2% dos casos de surtos notificados de DTAs, sendo que a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram os principais agente etiológicos identificados nesses surtos (BRASIL, 2018).

### 3.2 *Staphylococcus aureus*

Pertencente à família *Staphylococcaceae*, o gênero *Staphylococcus* abrange 37 espécies e 20 subespécies de bactérias (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SALVANI, 2018). São Gram positivas, de formato esférico e diâmetro que varia de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Se caracterizam pela formação de agrupamentos com formato de cachos de uvas (HARRIS et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Esses micro-organismos não são móveis, não formam esporos, podendo ser positivos na reação de catalase, a grande maioria é anaeróbio facultativo, exceto as espécies *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*, que são anaeróbios (BERTRAND; HUGUENIN; TALON, 2002).

Tem crescimento ótimo em condições aeróbias e em faixas de temperatura que variam de 18°C a 40°C. Algumas espécies são positivas à prova de coagulase e crescem em concentração de 10% de NaCl (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SALVANI, 2018). Tem como valores pH ideal para o crescimento de 6,0 a 7,0, contudo, pode crescer em uma escala de pH que varia de 4,0 a 9,8 (FRANCO; LANDGRAFF, 2000).

O *S. aureus* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, que possui como seu maior potencial patogênico a produção de toxinas termoestáveis. Quando presentes em alimentos, essas toxinas podem permanecer viáveis mesmo após a inativação dos micro-organismos (PELISSER et al., 2009; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

A severidade da intoxicação provocada pela ingestão das enterotoxinas estafilocócicas (EE), dependerá da quantidade ingerida e da susceptibilidade do indivíduo, sendo que os sintomas podem aparecer até 8 horas da ingestão de alimentos contaminados (SILA; SAUER; KOLAR, 2009; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Acredita-se que cerca de 20% a 50% da população seja colonizada por essa bactéria, já que ela pode compor a microbiota bacteriana da pele e mucosas nos seres humanos. Dessa forma, a manipulação inadequada dos alimentos, associada aos hábitos de higiene impróprios pelos manipuladores contaminados, se torna a principal forma de contaminação dos alimentos por *S. aureus* (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; RALL et al., 2010).

Além disso, o *S. aureus* é o principal agente etiológico identificado como causador de mastites clínicas e subclínicas em bovinos (FREITAS et al., 2018; GIARDINI et al., 2016). Dessa forma, em alimentos de origem láctea, essa espécie tem especial importância para a segurança do consumo.

### 3.3 Intoxicação estafilocócica

A intoxicação alimentar provocada pelos estafilococos é resultante da ingestão de proteínas extracelulares de baixo peso molecular, pertencentes à família das toxinas pirogênicas (PT), denominadas enterotoxinas estafilocócicas (EE). Essas são pré-formadas no alimento contaminado, essencialmente através da manipulação humana, ou da matéria-prima obtida de animais. Fazem parte desse grupo a toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), e as toxinas esfoliativas tipos A e B (*eta* e *etb*), entre outras (LUZ, 2009).

Atualmente, 23 tipos de enterotoxinas estafilocócicas foram caracterizadas e classificadas estando relacionadas a casos de intoxicação (BENKERROUM, 2017; LI et al., 2018). Todavia, mesmo com essa grande variedade de toxinas, 95% dos casos de intoxicação alimentar estão relacionados pelas EEs A, B, C, D e E (LETERTRE et al., 2003).

As EEs e a toxina da síndrome do choque tóxico têm seu mecanismo de ação através da ativação massiva de linfócitos T. Isso acontece devido à ligação das toxinas ao complexo de histocompatibilidade tipo II, com consequente liberação em larga escala de citocinas pró-inflamatórias que levam a ocorrência dos sinais clínicos (ETTER, et al., 2020).

A intoxicação estafilocócica se dá pela ingestão de alimentos contaminados com a bactéria, que não passaram por um tratamento térmico ou insuficiente para inativação do micro-organismos, e depois foram conservados sob temperaturas inadequadas, propiciando a proliferação bacteriana com consequente produção de toxinas (GERMANO; GERMANO, 2015). Da mesma forma, as toxinas produzidas nos alimentos crus podem permanecer ativas mesmo após a eliminação das formas vegetativas pela sua termorresistência (PELISSER et al., 2009).

A presença de EEs está relacionada com a capacidade de multiplicação da população bacteriana em atingir cerca de  $10^5$  UFC/g ou mL, parâmetro esse que é utilizado como sugestivo para a presença de EEs em quantidade suficiente para causar intoxicação (LANDGRAF; DESTRO, 2013).

A produção das toxinas estafilocócicas podem ser influenciadas por fatores genéticos e/ou ambientais (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). Genes reguladores, transmitidos de forma funcional através da multiplicação de bactérias e o aumento ou diminuição da produção dessas toxinas, a depender da fase de multiplicação bacteriana,



são exemplos das influências genéticas inerentes ao potencial toxigênico dos estafilococos. A densidade bacteriana, o pH e a concentração de CO<sub>2</sub> também influenciam a produção das toxinas estafilocócicas (BRONNER; MONTEIL; PREVÓST, 2004).

Os sintomas ligados à intoxicação por EEs podem ocorrer de forma branda, moderada ou severa, a depender da quantidade e tipo de EE envolvida. Contudo os sinais clínicos mais comuns são êmese, mal-estar, prostração, diarreia não sanguinolenta, sudorese e cólicas abdominais (SABIONI; HIROOJA; SOUZA, 1988; BRASIL, 2010).

De acordo com Nema et al. (2007), a sintomatologia pode aparecer, geralmente, de uma a seis horas decorridos da ingestão das enteroxinas produzidas pelas cepas *S. aureus* nos alimentos e a duração do quadro clínico pode perdurar por 7 a 10 dias. Comumente não é fatal, mas configura risco em casos de pacientes geriátricos, neonatos ou pacientes com imunodepressão (FERREIRA et al., 2010).

### **3.4 Resistência a antibióticos**

Algumas cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos podem apresentar resistência a antibióticos que são utilizados rotineiramente na terapêutica de doenças em seres humanos (MEDEIROS et al., 2009).

Por volta da década de 1960 surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), porém em 1980 essas cepas acabaram configurando um importante problema clínico e epidemiológico em ambientes hospitalares. Desde então essas cepas começaram a se espalhar para fora dos hospitais (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SALVANI, 2018).

O surgimento de linhagens multirresistentes nas últimas décadas podem estar relacionado com a pressão seletiva devido ao uso indiscriminado e intensivo de antimicrobianos na medicina humana e veterinária (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; RAPINI et al., 2004). A resistência à meticilina das cepas MRSA se deve à presença de uma proteína que se liga à penicilina (PBP) alterada - PBP2a, promovendo baixa afinidade a todos os antibióticos beta-lactâmicos. Essa proteína ligadora é codificada pelo gene *mecA* (WINN et al., 2006).

Gill et al. (2005) destacam que o tratamento e o controle das infecções causadas pelo *S. aureus* têm se tornado bastante árduo, visto que, essas bactérias, adquiriram

resistência às principais classes de antibióticos utilizados, como penicilinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, entre outros.

Bactérias resistentes que podem ser normalmente encontradas em animais de produção utilizados como alimentos, possuem a capacidade de contaminar os produtos alimentícios advindos desses animais e serem transferidas para humanos através da alimentação (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004). Segundo Witte (2000), no trato gastrointestinal os genes que conferem a resistência antimicrobiana desses micro-organismos podem, ainda, serem transferidos a outras bactérias.

Desse modo, levando em consideração o grande número de cepas multirresistentes, e a grande facilidade de transmissão dessa capacidade, torna-se primordial a caracterização do perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos às diferentes classes de antibióticos, verificando a sua origem e o estabelecimento de medidas de controle. Essa ferramenta permite a identificação de linhagens resistentes que podem estar sendo selecionadas levando ao comprometimento do tratamento das doenças ocasionadas por essas bactérias.

Para identificação dos perfis de susceptibilidade aos diferentes tipos de antimicrobianos, o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2020) recomenda testes de análise fenotípica dos isolados. Contudo, essa identificação pode ser realizada, entre outras técnicas, através da análise de genes associados a resistência por abordagem molecular (ZOCHE et al., 2009) e a técnica de difusão em disco pela técnica de Bauer et al. (1966).

### **3.5 Utilização de PCR para identificação de *S. aureus* e genes associados à produção de enterotoxinas**

Constitui-se como condição indispensável para a determinação da fonte de infecção de uma determinada doença, a correta identificação do agente etiológico (CLSI, 2020).

Considerando o grande impacto dos micro-organismos patogênicos desencadeadores das DTAs, se torna cada vez mais necessário que os métodos de diagnóstico sejam mais eficientes e precisos, contribuindo no controle dos surtos dessas doenças (CHIN, 2002). As técnicas moleculares, como por exemplo a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), têm se mostrado muito eficientes e objetivas no diagnóstico de doenças de origem alimentar (ANDRADE et al., 2010).

Diversos estudos utilizando a técnica de PCR para identificação de *S. aureus* e/ou suas toxinas em alimentos foram realizadas (FACCIOLI, 2010; ZOCCHÉ; SILVA, 2012; DIEDRICH et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014, GODINHO, 2018). Essa metodologia possui grande relevância junto ao inquérito epidemiológico de surtos de intoxicação por toxinas estafilocócicas, em virtude da possibilidade de detectar as variedades de EE e os genes associados a elas em alimentos de origem animal (ZOCCHÉ; BASTOS; SILVA, 2010).

A identificação de cepas enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positiva, principalmente de *S. aureus*, em alimentos de origem animal utilizando a técnica de PCR foi relatada pela primeira vez no estudo de Wilson et al. (1991). Desde então, algumas variantes dessa metodologia foram criadas com essa mesma finalidade, dentre as quais podemos citar a PCR multiplex (SHYLAJA et al., 2010).

Em comparação com outras técnicas aplicáveis, a PCR multiplex apresenta a possibilidade de detecção simultânea de vários genes das EEs. Isso se deve a característica dessa metodologia de, na mesma reação, utilizar dois pares ou mais de iniciadores específicos, possibilitando a detecção simultânea de mais de um gene (ZOCCHÉ et al., 2009).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 741-750, 2010.
- BAUER, Alfred et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BENKERROUM, Noredine. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 12, p. 1943-1970, 2017.
- BERTRAND, X.; HUGUENIN, Y.; TALON, D. First report of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 3, p. 245-246, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_eletronico\\_epi\\_ano05\\_n06.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano05_n06.pdf). Acesso em: 11 de janeiro de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. 11 a 84 p., 2010. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 20 de janeiro de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 01 de julho de 2020.
- BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 183-200, 2004.

CÂMARA, Ariadna Flores; MELO, Cristiano de. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p. 65-72, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.  
CHIN, James. Manual de controle das doenças transmissíveis. 17. ed. Porto Alegre: **Artmed**, pág. 561-561, 2002.

DIEDRICH, Clarissa et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 3, p. 320, 2013.

ETTER, Danaí et al. Staphylococcal enterotoxin C—an update on SEC variants, their structure and properties, and their role in foodborne intoxications. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 584, 2020.

FACCIOLI, Patrícia Yoshida. **Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente**. 2010. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2010.

FAGUNDES, Helena; OLIVEIRA, Carlos Augusto. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em paúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1315-1320, 2004.

FERREIRA et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “minas frescal” comercializados na região do triângulo mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**. Salvador, v.34, n.3, p.575-589, 2010.

FORSYTHE, Stephen. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed. 2000. 126p.

FRANCO, Bernadette; LANDGRAF, Mariza. Microbiologia dos alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. 2003. 182p.

FREITAS, Cristina et al. Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 661-666, 2018.

GHERARDI, G.; DI BONAVENTURA, G.; SAVINI, V. Staphylococcal taxonomy. In: **Pet-To-Man Travelling Staphylococci**. Academic Press, 2018. p. 1-10.

GIRARDINI, Lilian et al. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 951-956, 2016.

GERMANO, Pedro; GERMANO, Maria Izabel. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 5 ed. Barueri: Manole. 2015. 364p.

GODINHO, Fernanda et al. Detecção de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru de búfala. **Bol. epidemiol.**, v 20, p. 8-8, 2018.

GILL, Steven et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2426-2438, 2005.

HARRIS, Linos et al. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **Eur Cell Mater**, v. 4, n. 3, p. 100-20, 2002.

KIM, Min-Kyung. *Staphylococcus aureus* toxins: from their pathogenic roles to anti-virulence therapy using natural products. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 24, n. 3, p. 424-435, 2019.

LANDGRAF, Mariza; DESTRO, Maria Teresa. Staphylococcal food poisoning. In: **Foodborne Infections and Intoxications**. Academic Press, 2013. 389-400p.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LETERTRE, Capucine et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes sea to sej. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, n. 4, p. 139-147, 2003.

LI, Suixia et al. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail raw chicken meat. **Journal of food protection**, v. 81, n. 4, p. 528-533, 2018.

LUZ, Isabelle. Molecular characterization of toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and "coalho" cheese in cities from the Agreste region of Pernambuco. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 140-140, 2009.

MALACRIDA, A. M.; DIAS, V. H. C.; DE LIMA, C. L. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, p. 158-162, 2017.

MEDEIROS, Elizabeth et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 569-574, 2009.

MELO, Eveny de et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **Pubvet**, v. 12, p. 131, 2018.

NEMA, Vijay et al. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 29-35, 2007.

OLIVEIRA, Ana Beatriz Almeida de et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, vol. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

PELISSER, Marcia Regina et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 145-148, 2009.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

RALL, Vera Lúcia et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 59-65, 2010.

RAJALA-SCHULTZ, Päivi et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary microbiology**, v. 102, n. 1-2, p. 33-42, 2004.

RAPINI, L. S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RODRIGUES, Kelly et al. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 447-452, 2003.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.

SANTOS, André Luis et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SHYLAJA, R. et al. A novel multiplex PCR system for the detection of staphylococcal enterotoxin B, tsst, nuc and fem genes of *Staphylococcus aureus* in food system. **Journal of food safety**, v. 30, n. 2, p. 443-454, 2010.

SILA, J.; SAUER, P.; KOLAR, M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *staphylococcus aureus* at the university hospital in Olomouc. **Biomed Pap. Med. Fac**, v. 53, n. 3, p.215–218, 2009.

SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil-2005 a 2008. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 4-10, 2010.

SILVA, Júlio. Incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado de Pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 3, n. 1, p. 23-23, 2017.



TEIXEIRA, Junia et al. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes femA e mecA e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 3, p. 272-279, 2014.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

WILSON, I. G.; COOPER, J. E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1793-1798, 1991.

WINN, Washington. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Lippincott williams & wilkins, 2006.

WITTE, Wolfgang. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International journal of antimicrobial agents**, v. 14, n. 4, p. 321-325, 2000.

ZOCHE, Fernando et al. PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal em el sur de río grande do sul, Brasil. **Interciencia**, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

ZOCHE, Fernando; BASTOS, Caroline Peixoto; SILVA, Wladimir Padilha da. Detecção de genes do cluster *egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1134-1140, 2010.

ZOCHE, Fernando; SILVA, Wladimir Padilha da. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijo minas frescal. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, 2012.

## CAPÍTULO II

### 4 ARTIGO

#### POTENCIAL TOXIGÊNICO, DETERIORANTE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA ISOLADAS EM QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL NO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS

##### Resumo

O objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de estafilococos coagulase positiva (ECP) de 21 amostras de queijos tipo Minas Frescal clandestinos; pesquisar o potencial deteriorante em diferentes temperaturas; pesquisar por abordagem molecular o potencial toxigênico de *S. aureus*; determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* toxigênicos. A determinação da espécie foi realizada baseada na detecção de  $\beta$ -hemólise em ágar sangue ovino a 5%; fermentação dos açúcares manitol, maltose e trealose; e, pela produção de acetoina (teste de VP). Todos ECP foram avaliados quanto sua capacidade de proteólise e lipólise a temperatura mesofílica e psicotrófica. Após a determinação da espécie, as colônias de *S. aureus* foram submetidas à extração de DNA e pesquisa dos genes que codificam os fatores de virulência e toxinas estafilocócicas em dois ensaios de PCR multiplex. Foram pesquisados os genes *eta*, *etb*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*. Os isolados identificados como *S. aureus* toxigênico foram testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana a tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfazotrim, trimetropim, estreptomicina e enrofloxacina. Da totalidade de 355 isolados ECP, 177 (49,86%) foram identificados como *S. aureus*, 2 (0,56%) *S. intermedius*, 3 (0,84%) *S. hycus*, 2 (0,56%) *S. delphini*, e 1 (0,28%) *S. coagulans*. Do total de 173 isolados de *S. aureus*, 25 (52,08%) foram positivos para o gene *tst*, que codifica a síntese da toxina de choque tóxico. Outros 16 (33,33%) foram positivos para o gene *sea*, assim como quatro (8,33%) foram positivos *see*, e um isolado positivo para cada um dos genes *seb* (2,08%), *sec* (2,08%) e *etb* (2,08%). Todos os isolados demonstraram atividade lipolítica sob condições mesófilas e psicrotrófica. Em relação à atividade proteolítica, as espécies *S. intermedius* e *S. hycus* se destacaram. Em relação a sensibilidade antimicrobiana, foi observado multirresistência na maioria dos isolados, sendo a clindamicina foi o princípio ativo com menor eficiência (40%), já o grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) foi o grupo com maior eficiência, sendo capaz de inibir todos os isolados avaliados. Os queijos tipo minas frescal, comercializados no norte do estado do tocantins, estão em desacordo com os padrões legais de qualidade e podem oferecer risco à saúde pública pelo potencial toxigênico de cepas multirresistentes.

**Palavras chaves:** Antibiograma, Enterotoxinas, Estafilococos, Lipólise, Proteólise.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to identify the coagulase-positive staphylococci (ECP) species from 21 samples of clandestine Minas Frescal cheeses; investigate the deteriorating potential at different temperatures; to investigate by molecular approach the toxigenic potential of *S. aureus*; to determine the antimicrobial susceptibility profile of toxigenic *S. aureus*. Species determination was performed based on detection of  $\beta$ -hemolysis on 5% sheep blood agar; fermentation of the sugars mannitol, maltose and trehalose; and by the production of acetoin (VP test). All ECPs were evaluated for their ability to proteolysis and lipolysis at mesophilic and psychrotrophic temperatures. After species determination, *S. aureus* colonies were subjected to DNA extraction and search for genes encoding virulence factors and staphylococcal toxins in two multiplex PCR assays. The *eta*, *etb*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes were searched. Isolates identified as toxigenic *S. aureus* were tested for antimicrobial susceptibility to tetracycline, erythromycin, clindamycin, gentamicin, ciprofloxacin, sulfazotrim, trimethoprim, streptomycin, and enrofloxacin. Of the total of 355 ECP isolates, 177 (49.86%) were identified as *S. aureus*, 2 (0.56%) *S. intermedius*, 3 (0.84%) *S. hycus*, 2 (0.56%) *S. delphini*, and 1 (0.28%) *S. coagulans*. Of the 173 isolates of *S. aureus*, 25 (52.08%) were positive for the *tst* gene, which encodes the synthesis of toxic shock toxin. Another 16 (33.33%) were positive for the *sea* gene, as well as four (8.33%) were positive for *see*, and one isolate was positive for each of the *seb* genes (2.08%), *sec* (2.08 %) and *etb* (2.08%). All isolates showed lipolytic activity under mesophilic and psychrotrophic conditions. Regarding the proteolytic activity, the species *S. intermedius* and *S. hycus* stood out. In relation to antimicrobial sensitivity, multidrug resistance was observed in most of the isolates, with clindamycin being the active ingredient with the lowest efficiency (40%), whereas the group of aminoglycosides (gentamicin and streptomycin) was the group with the highest efficiency, being able to inhibit all isolates evaluated. Minas Frescal cheeses, marketed in the north of the state of Tocantins, do not comply with legal quality standards and may pose a risk to public health due to the toxigenic potential of multiresistant strains.

**Keywords:** Antibiogram, Enterotoxins, Lipolysis, Proteolysis, Staphylococci.

## INTRODUÇÃO

O queijo tipo Minas Frescal é um dos derivados do leite mais consumidos no Brasil. É caracterizado como produto obtido por coagulação enzimática do leite com enzimas coagulantes (BRASIL, 2004). Em decorrência do processamento simples, ausência de maturação e o alto rendimento, associado com a aceitabilidade do consumidor brasileiro, a produção de queijos tipo Minas Frescal é muito frequente (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014).

Quando produzidos de forma clandestina, sem fiscalização sanitária, potencialmente em condições higiênicas insatisfatórias e a partir do leite cru (SOUZA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2021), esse produto pode ser veículo de diversos patógenos de origem alimentar expondo o consumidor ao risco de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (AMORIM et al., 2014). Dentro do grupo das bactérias responsáveis por surtos de DTAs pode-se destacar os *Staphylococcus aureus*, como potenciais causadores de contaminação em diversos alimentos (BRASIL, 2018; ANDRADE JÚNIOR et al., 2019).

A presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em alimentos processados, em especial os coagulase positiva, pode ser indicativo de falhas higiênico-sanitárias na manipulação (SILVA et al., 2020). Alimentos produzidos a partir de leite, especialmente, tem importância destacada considerando que *Staphylococcus* spp. são mais comumente identificados como micro-organismos causadores de mastite (SÁ et al., 2004; LEE et al., 2012).

Algumas espécies possuem a capacidade de produzir toxinas que comprometem a segurança dos alimentos contaminados expondo o consumidor à riscos de intoxicações (SANTIAGO et al., 2013), mesmo após a eliminação das formas vegetativas dos micro-organismos pela pasteurização. Trata-se de proteínas extracelulares de baixo peso molecular, denominadas enterotoxinas estafilocócicas (EE) (LUZ, 2009). Contagens superiores a  $10^5$  UFC de *Staphylococcus*/g ou mL nos alimentos é relatada como suficiente para provocar um quadro clínico de intoxicação (BERGDOLL, 1989), se esses organismos forem potencialmente produtores de EE.

Considerando a importância de *Staphylococcus* coagulase positiva para a saúde pública e para o processo tecnológico de queijos, o objetivo do presente trabalho foi determinar a contagem dos estafilococos coagulase positiva (ECP); determinar as espécies de ECP mais incidentes no queijo tipo Minas Frescal através de diferenciação

bioquímica; seu potencial toxigênico por abordagem molecular; o potencial deteriorante em diferentes condições de temperatura; e, a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* potencialmente enterotoxigênicos obtidos de queijos tipo Minas Frescal produzidos e comercializados informalmente no norte do estado do Tocantins

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Contagem de estafilococos coagulase positiva**

Foram analisadas 21 amostras de queijo tipo Minas Frescal adquiridas no comércio informal (feiras) na cidade de Araguaína, Tocantins, Brasil, entre abril e junho de 2019. As amostras foram mantidas sob refrigeração em suas embalagens originais e imediatamente avaliadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT).

A contagem de ECP foi realizada conforme recomendações da Organização Internacional de Padronização (ISO) 6888-1:1999/Amd 1:2003 (ISO, 2003). A prova de produção da enzima coagulase foi realizada segundo a metodologia proposta por Costa et al. (2011) utilizando-se plasma equino. A quantificação bacteriana foi computada conforme 7218:2007/Amd 1:2003 e os resultados foram expressos em UFC/g.

### **Diferenciação bioquímica espécie-específica**

As colônias positivas na prova de coagulase foram purificadas por repiques sucessivos em ágar padrão para contagem (PCA) e incubação a 35°C por 24 horas. A partir da obtenção dos isolados puros em placas, foi realizada a prova de catalase e fixação pelo calor das colônias em lâminas de microscopia e realização da coloração de Gram conforme Forsythe (2000). A leitura foi realizada em microscópio óptico em aumento de 100x. Os isolados que apresentavam características morfotintoriais do gênero *Staphylococcus* spp. seguiram para etapa de diferenciação por provas bioquímicas.

Os isolados foram testados quanto a capacidade de hemólise, pela inoculação em ágar sangue de ovino 5%, capacidade fermentativa dos carboidratos maltose, trealose e manitol e ainda foi verificada a capacidade de produção acetoina (VP), segundo modelo proposto por Costa et al. (2010) para diferenciação de espécies de ECP. A interpretação dos resultados ocorreu conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Interpretação do método simplificado de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva conforme Costa et al. (2010).

| Bioquímico | <i>S. aureus</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. hycus</i> | <i>S. delphini</i> | <i>S. coagulans</i> |
|------------|------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| Hemólise   | +                | d                     | -               | +                  | +                   |
| Teste VP   | +                | -                     | -               | -                  | +                   |
| Manitol    | +                | (d)                   | -               | +                  | (d)                 |
| Maltose    | +                | (w)                   | -               | (nd)               | -                   |
| Trealose   | +                | +                     | +               | -                  | -                   |

<sup>nd</sup>Não determinado. <sup>d</sup>>11-89% de cepas positivas. <sup>w</sup>Reação positiva fraca. <sup>VP</sup>Voges Proskauer (produção de acetoina).

### Caracterização molecular do potencial enterotoxigênico

Os isolados positivos para alguma espécie de ECP, identificados através da etapa de diferenciação bioquímica, foram submetidos à extração de DNA genômico conforme Ribeiro Júnior et al. (2016) e posterior reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes que codificam a síntese das toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) e toxinas estafilocócicas A, B, C, D e E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*). Foram realizadas duas reações de multiplex com os *primers* descritos por Mehrotra et al. (2000) e condições de amplificação modificadas conforme a Tabela 2.

**Tabela 2.** Genes que codificam a produção de toxinas estafilocócicas, *primers*, produtos esperados e condições de amplificação individual de cada ensaio multiplex conforme Mehrotra et al. (2000) e modificações otimizadas.

| Gene       | <i>Primers</i>                                   | pb  | Amplificação   |
|------------|--|-----|--|
| <i>tst</i> | ACCCCTGTTCCCTTATCATC<br>TTTTCAGTATTTGTAACGCC     | 326 |  |
| <i>eta</i> | GCAGGTGTTGATTTAGCATT<br>AGATGTCCCTATTTTTGCTG     | 93  | 94°C-5m 35x (92°C-2m,<br>57°C-2m, 72°C-1m)<br>72°C-7m    |
| <i>etb</i> | ACAAGCAAAAGAATACAGCG<br>GTTTTGGCTGCTTCTCTTG      | 226 |  |
| <i>sea</i> | GGTTATCAATGTGCGGGTGG<br>CGGCACTTTTTCTCTTCGG      | 102 |  |
| <i>seb</i> | GTATGGTGGTGTAACTGAGC<br>CCAAATAGTGACGAGTTAGG     | 164 |  |
| <i>sec</i> | AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG<br>CACACTTTTAGAATCAACCG | 451 | 95°C-5m 35x (95°C-45s,<br>52°C-50s, 72°C-1m)<br>72°C-10m |
| <i>sed</i> | CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG<br>ATTGGTATTTTTTTTCGTTC  | 278 |  |
| <i>see</i> | AGGTTTTTTCACAGGTCATCC<br>CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC   | 209 |  |

A PCR foi realizada de acordo com a seguinte constituição: ≈ 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada dNTP, 2,5 µL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol/L

de cada *primer*, 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA) e água ultrapura para completar o volume final de 25  $\mu$ L. Os produtos então amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em solução de brometo de etídio a 20 mg/L por 20 min e documentados sob luz ultravioleta.

### **Potencial proteolítico e/ou lipolítico**

Todos isolados identificados ao nível de espécie de *Staphylococcus* foram avaliados quanto a sua capacidade proteolítica e/ou lipolítica em diferentes condições de temperatura. As colônias foram purificadas em ágar PCA, com posterior inoculação em meios específicos.

Para avaliação da capacidade proteolítica, as colônias foram inoculadas em ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA), suplementado na proporção 9:1 com solução de leite em pó reconstituído a 10%, incubadas a 35°C por 48 horas, para avaliação deteriorante em temperatura mesófila e, uma duplicata, à 7°C por 10 dias para verificação de proteólise em condição psicrotrófica (BEERENS; LUQUET, 1990). A formação de halo translúcido foi considerada positiva para atividade proteolítica.

Já para verificação da atividade lipolítica as bactérias foram inoculadas em ágar tributirina (Himedia, Mumbai, India) suplementado a 99:1 com tributirina (Himedia), conforme Hantsis Zacharov e Halpern (2007). As condições de incubação, tempo e temperatura, bem como a interpretação dos resultados, foi realizada nas mesmas condições da avaliação de atividade proteolítica.

### **Resistência antimicrobiana**

Foram selecionados isolados de *S. aureus* positivos para algum gene de produção de enterotoxinas através da técnica de PCR, oriundos de amostras de queijos distintas. Como algumas amostras tiveram colônias com diferentes potenciais de produção de toxinas, de algumas amostras foram selecionadas mais de uma colônia.

Os quimioterápicos utilizados foram tetraciclina (TET 30  $\mu$ g), eritromicina (ERI 15  $\mu$ g), clindamicina (CLI 2  $\mu$ g), gentamicina (GEN 10  $\mu$ g), ciprofloxacina (CIP 5  $\mu$ g), sulfazotrim (SUT 1,25/23,75  $\mu$ g), trimetropim (TRI 5  $\mu$ g), estreptomina (EST 10  $\mu$ g) e enrofloxacina (ENO 5  $\mu$ g).

Os antibiogramas foram realizados segundo modelo de difusão em disco pela técnica de Bauer et al. (1966). Os resultados foram interpretados conforme o

recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de ECP variaram de  $<10^3$  a  $1,7 \times 10^7$  UFC/g com média (desvio padrão) de  $2,4 (\pm 4,2) \times 10^6$  UFC/g nas 21 amostras de queijos Minas Frescal (QMF) avaliadas. Foram recuperados 355 isolados de ECP de 18 (85,71%) amostras de QMF. As amostras foram identificadas bioquimicamente por espécie conforme a Tabela 3.

Foi observada elevada quantificação de ECP nas amostras avaliadas. Assim como foi verificado nos estudos de Souza et al. (2017), Vinha, Oliveira e Chaves (2018) e Boas et al. (2020) também avaliando amostras de QMF. De acordo com Bergdoll (1989), contagens de ECP superiores a  $10^5$  UFC/g são suficientes para o potencial de provocar um quadro clínico de intoxicação. Nesse contexto, 17 (80,95%) das amostras do presente trabalho apresentariam risco de provocar DTA. No entanto, sabe-se que a produção de toxinas estafilocócicas está relacionada ao potencial genético, ou seja, características autóctones dos isolados que compõem essa microbiota (PINTO, 2014) além de fatores ambientais que estimulem o micro-organismo a sintetizar o metabólito (MEDEIROS et al., 2013).

As legislações brasileiras que regulamentam a qualidade de QMF nas indústrias (BRASIL, 2004) e no comércio (BRASIL, 2019) estabelecem como padrão para QMF contagens máximas de  $10^3$  UFC/g. Nesse contexto, 18 (85,71%) estão em desacordo com o padrão microbiológico previsto na legislação.

O protocolo de diferenciação bioquímica das espécies foi suficiente para identificação de 52,12% dos 355 isolados recuperados. Foi observado o predomínio de *S. aureus* (49,86%) em relação às outras espécies de ECP. Esse resultado era esperado, uma vez que esse micro-organismo é o principal agente etiológico de mastites clínica e subclínica em bovinos (NOEL et al., 2016; GASPAROTTO et al., 2016; SILVA; ALCÂNTARA; MOTA, 2018; ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020; ZAATOUT; AYACHI; KECHA, 2020). Além disso, as amostras de QMF avaliadas pelo presente trabalho foram produzidas potencialmente com leite cru, apresentando micro-organismos dessa espécie na composição da sua microbiota (MISIC et al., 2015; HAAG; FITZGERALD; PENADÉS, 2019) e, além de ser um importante micro-organismo indicador da qualidade higiênico-sanitária da manipulação de alimentos, sabidamente realizada de forma



**Tabela 3.** Identificação bioquímica de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de 21 amostras de queijos tipo Minas Frescal clandestinos comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

| <b>Amostra</b>   | <b>No. Isolados</b> | <i>S. aureus</i>   | <i>S. intermedius</i> | <i>S. hycus</i> | <i>S. delphini</i> | <i>S. coagulans</i> | <i>Staphylococcus</i><br>spp. |
|------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|
| 1                | —                   | —                  | —                     | —               | —                  | —                   | —                             |
| 2                | —                   | —                  | —                     | —               | —                  | —                   | —                             |
| 3                | 19                  | 6                  | —                     | —               | —                  | —                   | 13                            |
| 4                | 8                   | 5                  | —                     | —               | —                  | —                   | 3                             |
| 5                | 4                   | —                  | —                     | —               | —                  | —                   | 4                             |
| 6                | 4                   | —                  | —                     | —               | —                  | —                   | 4                             |
| 7                | 15                  | 3                  | 1                     | —               | —                  | —                   | 11                            |
| 8                | 33                  | 15                 | —                     | —               | 1                  | 1                   | 16                            |
| 9                | 13                  | 1                  | —                     | —               | —                  | —                   | 12                            |
| 10               | 19                  | 11                 | —                     | —               | —                  | —                   | 8                             |
| 11               | 27                  | 7                  | —                     | —               | —                  | —                   | 20                            |
| 12               | 8                   | 3                  | —                     | —               | —                  | —                   | 5                             |
| 13               | 29                  | 17                 | —                     | —               | —                  | —                   | 12                            |
| 14               | 20                  | 15                 | —                     | —               | —                  | —                   | 5                             |
| 15               | 36                  | 27                 | —                     | —               | —                  | —                   | 9                             |
| 16               | 20                  | 18                 | —                     | —               | —                  | —                   | 2                             |
| 17               | 29                  | 27                 | —                     | —               | —                  | —                   | 2                             |
| 18               | 30                  | 4                  | 1                     | 1               | —                  | —                   | 24                            |
| 19               | 12                  | 9                  | —                     | —               | —                  | —                   | 3                             |
| 20               | 29                  | 9                  | —                     | 2               | 1                  | —                   | 17                            |
| 21               | —                   | —                  | —                     | —               | —                  | —                   | —                             |
| <b>Total (%)</b> | <b>355 (100)</b>    | <b>177 (49,86)</b> | <b>2 (0,56)</b>       | <b>3 (0,84)</b> | <b>2 (0,56)</b>    | <b>1 (0,28)</b>     | <b>170 (47,88)</b>            |

inadequada na produção de queijos clandestinos (VINHA; OLIVEIRA; CHAVES, 2018; CAMPOS et al., 2021).

Foi observada maior diversidade de espécies de ECP nas amostras de QMF 8, 18 e 21. Não observado nenhum fator de origem/local ou ambiental, durante a comercialização do produto, que poderia ter influenciado nessa maior diversidade. Nesse contexto, destaca-se a amostra 8, única que apresentou *Staphylococcus coagulans*.

*S. coagulans*, desde 1990, estava classificado como *S. schleiferi subsp. coagulans* (IGIMI; TAKAHASHI; MITSUOKA, 1990), contudo em 2020, como base em diferenças genômicas, foi reclassificado como *S. coagulans* (MADHAIYAN; WIRTH; SARAVANAN, 2020). Sabidamente, trata-se de uma bactéria oportunista, podendo ser encontrada compondo a microbiota bacteriana da pele de alguns mamíferos, incluindo o homem, principalmente cães de companhia, e possui potencial zoonótico (PATERSON, 2021). Nesse contexto, a contaminação que levou ao isolamento desta espécie no queijo analisado pode ser decorrente de falhas higiênico-sanitárias dos manipuladores ao longo das etapas de produção.

Os resultados em relação ao potencial proteolítico e/ou lipolítico dos isolados em cada condição de temperatura avaliada está descrito na Tabela 4, na qual é possível observar o predomínio de proteólise e lipólise das espécies *S. intermedius* e *S. hycus* tanto em temperatura mesofílica quanto em temperatura psicotrófica. A colônia identificada como *S. coagulans*, mostrou-se proteolítica em temperatura psicotrófica, mas não mostrou esse potencial em temperatura mesofílica.

Sabe-se que micro-organismos deteriorantes estão relacionados a diversos problemas tecnológicos em queijos frescos, como a rancificação, proteólise tardia, alterações sensoriais e redução da vida útil (FORSYTHE, 2013; CAMARGO et al., 2021). Esses problemas são decorrentes da ação de enzimas bacterianas, liberadas durante seu processo de multiplicação (COUSIN, 1982), comprometendo a integridade dos componentes lácteos, já que são termoestáveis, podendo permanecer ativas mesmo após a inativação dos micro-organismo e suas formas vegetativas (BAGLINIÈRE et al., 2017; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2018; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2019).

Nas amostras avaliadas pelo presente trabalho foram observadas elevadas contagens de ECP e atividade proteolítica e/ou lipolítica sob refrigeração, condição de armazenamento de QMF. Dessa forma, é possível esperar que esses problemas tecnológicos representem outro prejuízo à sua qualidade e vida útil. Conforme pode ser

**Tabela 4.** Potencial proteolítico e/ou lipolítico de espécies de *Staphylococcus* isolados de queijos tipo Minas Frescal Clandestinos comercializados em Araguaína, Tocantins, de abril a junho de 2019.

| Espécies de <i>Staphylococcus</i> | Amostra de queijo     | Total de isolados na amostra | Proteólise  |              | Lipólise    |              |         |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|---------|
|                                   |                       |                              | 7°C/10d (%) | 35°C/48h (%) | 7°C/10d (%) | 35°C/48h (%) |         |
| <i>S. aureus</i>                  | 3                     | 6                            | —           | 3 (50)       | 6 (100)     | 6 (100)      |         |
|                                   | 4                     | 5                            | 1 (20)      | 1 (20)       | 5 (100)     | 5 (100)      |         |
|                                   | 7                     | 3                            | 1 (33,3)    | 2 (66,6)     | 3 (100)     | 3 (100)      |         |
|                                   | 8                     | 15                           | 13 (86,6)   | 9 (60)       | 15 (100)    | 15 (100)     |         |
|                                   | 9                     | 1                            | 1 (100)     | 1 (100)      | 1 (100)     | 1 (100)      |         |
|                                   | 10                    | 11                           | 3 (27,7)    | 7 (63,6)     | 11(100)     | 11(100)      |         |
|                                   | 11                    | 7                            | 2 (28,5)    | 7 (100)      | 7 (100)     | 7 (100)      |         |
|                                   | 12                    | 3                            | —           | 1 (33,3)     | 3 (100)     | 3 (100)      |         |
|                                   | 13                    | 17                           | 3 (17,6)    | 14 (82,3)    | 17 (100)    | 17 (100)     |         |
|                                   | 14                    | 15                           | 3 (20)      | 9 (75)       | 15 (100)    | 15 (100)     |         |
|                                   | 15                    | 27                           | 12 (44,4)   | 25 (92,5)    | 27 (100)    | 27 (100)     |         |
|                                   | 16                    | 18                           | —           | 17 (94,4)    | 18 (100)    | 18 (100)     |         |
|                                   | 17                    | 27                           | —           | 25 (92,5)    | 27 (100)    | 27 (100)     |         |
|                                   | 18                    | 4                            | —           | —            | 4 (100)     | 4 (100)      |         |
|                                   | 19                    | 9                            | —           | 1 (11,1)     | 9 (100)     | 9 (100)      |         |
|                                   | 20                    | 9                            | 1 (11,1)    | 6 (66,6)     | 9 (100)     | 9 (100)      |         |
|                                   | Total (%)             | 177 (100)                    | 40 (22,59)  | 128 (72,31)  | 177 (100)   | 177 (100)    |         |
|                                   | <i>S. intermedius</i> | 7                            | 1           | 1 (100)      | 1 (100)     | 1 (100)      | 1 (100) |
|                                   |                       | 18                           | 1           | 1 (100)      | 1 (100)     | 1 (100)      | 1 (100) |
|                                   |                       | Total (%)                    | 2 (100)     | 2 (100)      | 2 (100)     | 2 (100)      | 2 (100) |
| <i>S. hicus</i>                   | 18                    | 1                            | 1 (100)     | 1 (100)      | 1 (100)     | 1 (100)      |         |
|                                   | 20                    | 2                            | 2 (100)     | 2 (100)      | 2 (100)     | 2 (100)      |         |
|                                   | Total (%)             | 3 (100)                      | 3 (100)     | 3 (100)      | 3 (100)     | 3 (100)      |         |
| <i>S. delphini</i>                | 8                     | 1                            | 1 (100)     | —            | 1 (100)     | 1 (100)      |         |
|                                   | 20                    | 1                            | —           | 1 (100)      | 1 (100)     | 1 (100)      |         |
|                                   | Total (%)             | 2 (100)                      | 1 (50)      | 1 (50)       | 2 (100)     | 2 (100)      |         |
| <i>S. coagulans</i>               | 8                     | 1                            | 1 (100)     | —            | 1 (100)     | 1 (100)      |         |
|                                   | Total (%)             | 1 (100)                      | 1 (100)     | —            | 1 (100)     | 1 (100)      |         |

observado na Tabela 4, a espécie *S. aureus* foi predominantemente proteolítica em condição mesófila (72,31%) e todos os isolados foram lipolíticos em condição mesófila e psicotrófica. O estudo de Ribeiro Júnior et al. (2018), avaliando os principais deteriorantes mesófilos e psicotróficos do leite cru refrigerado brasileiro, identificou as espécies *S. epidermidis* e *S. warneri*, demonstrando que esse gênero intrinsecamente pertence à microbiota do leite e possui potencial proteolítico e lipolítico.

A degradação lipídica, seja pela ação microbiana ou enzimática, pode causar rancidez nos queijos (SOBRAL et al., 2017). No presente trabalho, foi observado que todos os isolados avaliados possuíam atividade lipolítica, tanto em temperatura mesofílica quanto psicotrófica. Dessa forma, são esperadas alterações organolépticas não desejáveis em produtos frescos, o que conseqüentemente poderá levar à rejeição deste produto por parte dos consumidores.

O potencial toxigênico dos *S. aureus* está descrito na Tabela 5. Foi observado que 30% dos isolados apresentaram ao menos um gene que codifica a síntese de enterotoxinas com predomínio do potencial genético de *tst* e *sea*. positivos para 48,1% e 33,3% dos isolados com potencial toxigênico, respectivamente.

A toxina do choque tóxico, codificada pelo gene *tst*, foi relatada por Todd et al. (1978) acometendo crianças, num quadro clínico caracterizado por febre alta, hipotensão sanguínea, êmese, erupção cutânea, descamação da pele e comprometimento sistêmico. No presente trabalho, verificou-se o potencial genético para produção dessa toxina em 8 (38,09%) das amostras analisadas, com destaque à amostra 13, que apresentou 11 dos 17 isolados positivos para o gene *tst*, sendo potencialmente isolados clonais com possível multiplicação na amostra.

A legislação brasileira que regulamenta os padrões microbiológicos de queijos no comércio (BRASIL, 2019), estabelece que a quantificação de enterotoxinas estafilocócicas (ng/g) deve ser ausente. Infelizmente, em condições brasileiras, a rede laboratorial para quantificação de toxinas em alimentos ainda é pouco estruturada, o que dificulta a análise periódica de controle da qualidade em escala, restringindo sua aplicabilidade às análises de controle oficial dos produtos de estabelecimentos registrados.

No Brasil, o estudo de Cardoso et al. (2000) foi o primeiro a relatar cepas de *S. aureus* positivos para *tst* de amostras de leite provenientes de vacas com mastites no estado de Minas Gerais. Esse estudo verificou que 47% dos isolados avaliados possuíam potencial genético para produção da toxina do choque tóxico. Outros estudos

**Tabela 5.** Potencial genético de síntese de produção de toxinas estafilocócicas de isolados de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de 21 amostras de queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma clandestina em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

| Espécie de <i>Staphylococcus</i> | Amostra de queijo     | Total de isolados na amostra | Total de isolados com potencial genético de síntese de toxinas por amostra (%) | Toxinas estafilocócicas |            |            |            |            |            |            |            |         |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|--|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
|                                  |                       |                              |  | <i>eta</i>              | <i>etb</i> | <i>tst</i> | <i>sea</i> | <i>seb</i> | <i>sec</i> | <i>sed</i> | <i>see</i> |         |
| <i>S. aureus</i>                 | 3                     | 6                            | 4 (44,4)   | —                       | —          | 4          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 4                     | 5                            | 4 (80)   | —                       | —          | 4          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 7                     | 3                            | 2 (66,6)   | —                       | 1          | 1          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 8                     | 15                           | 8 (53,3)   | —                       | —          | 2          | —          | 1          | 1          | —          | 4          |         |
|                                  | 9                     | 1                            | 1 (100)  | —                       | —          | 1          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 10                    | 11                           | 2 (18,1)   | —                       | —          | 1          | —          | —          | 1          | —          | —          |         |
|                                  | 11                    | 7                            | —  | —                       | —          | —          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 12                    | 3                            | 1 (33,3)   | —                       | —          | 1          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 13                    | 17                           | 11 (64,7)  | —                       | —          | 11         | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 14                    | 15                           | —  | —                       | —          | —          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 15                    | 27                           | —  | —                       | —          | —          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 16                    | 18                           | 15 (83,3)  | —                       | —          | —          | 15         | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 17                    | 27                           | 3 (11,1)   | 2                       | —          | —          | 1          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 18                    | 4                            | —  | —                       | —          | —          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 19                    | 9                            | —  | —                       | —          | —          | —          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | 20                    | 9                            | 1 (11,1)   | —                       | —          | —          | 1          | —          | —          | —          | —          |         |
|                                  | <i>S. hycus</i>       | 20                           | 2  | 1 (50)                  | —          | —          | —          | 1          | —          | —          | —          | —       |
|                                  | <i>S. intermedius</i> | 8                            | 1  | 1 (100)                 | —          | —          | 1          | —          | —          | —          | —          | —       |
|                                  | Total (%)             |                              |  | 54 (100)                | 2 (3,7)    | 1 (1,8)    | 26 (48,1)  | 18 (33,3)  | 1 (1,8)    | 2 (3,7)    | —          | 4 (7,4) |

evidenciaram a grande quantidade de *S. aureus tst* positivo proveniente de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica (NADER FILHO et al., 2007; ROSSI, 2016; SEYOUM et al., 2016; BONSAGLIA, 2016), corroborando a hipótese que esses queijos foram produzidos com leite cru oriundo de vacas com mastite.

Foram selecionados 20 isolados identificados como *S. aureus*, com potencial genético de produção de toxinas, para verificação do potencial resistência antimicrobiana. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* com potencial genético de produção de toxinas isolados a partir amostras de queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma clandestina em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

| <b>Amostra de queijo</b> | <b>Potencial toxigênico</b> | <b>Resistência antimicrobiana*</b> |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 3                        | <i>tst</i>                  | —                                  |
| 4                        | <i>tst</i>                  | —                                  |
| 4                        | <i>tst</i>                  | CLI, CIP                           |
| 7                        | <i>tst</i>                  | CLI, SUT, TRI                      |
| 7                        | <i>etB</i>                  | TET                                |
| 8                        | <i>seB</i>                  | CLI, SUT, TRI                      |
| 8                        | <i>tst</i>                  | —                                  |
| 8                        | <i>seE</i>                  | ENO                                |
| 9                        | <i>tst</i>                  | TET, ERI, CLI                      |
| 10                       | <i>seC</i>                  | TET, ERI, CLI                      |
| 10                       | <i>tst</i>                  | CLI                                |
| 12                       | <i>tst</i>                  | CLI, SUT, TRI                      |
| 13                       | <i>tst</i>                  | ERI, CLI                           |
| 13                       | <i>tst</i>                  | SUT, TRI                           |
| 16                       | <i>seA</i>                  | TET, ERI                           |
| 16                       | <i>seA</i>                  | TET, ERI                           |
| 17                       | <i>seA</i>                  | —                                  |
| 17                       | <i>etA</i>                  | —                                  |
| 17                       | <i>etA</i>                  | —                                  |
| 20                       | <i>seA</i>                  | CLI, SUT, TRI                      |

CIP – ciprofloxacina, CLI – clindamicina, ENO – enrofloxacina, ERI – eritromicina, SUT – Sulfazotrim, TET – tetraciclina, TRI – trimetropim.

Foi possível observar que 14 (70%) isolados estudados possuem resistência ao menos uma classe dos antimicrobianos avaliados no trabalho, e que 11 (55%) são multirresistentes, ou seja, resistente a mais de uma classe de antibiótico. Dos antimicrobianos avaliados, a clindamicina foi a que se mostrou menos eficiente, seguida da tetraciclina, em que 8 (40%) e 5 (25%) dos isolados avaliados, respectivamente, mostraram-se resistentes a esses fármacos.

Os antimicrobianos sulfazotrim, trimetoprim e eritromicina, obtiveram a mesma taxa de ineficiência frente os isolados estudados, 20% (n = 4). Ao analisar eficácia da ciprofloxacina e enrofloxacin apenas 1 (5%) colônia foi resistente a cada antimicrobiano. Dos antibióticos avaliados, a gentamicina e estreptomicina, aminoglicosídeos de amplo espectro, se mostraram eficientes sobre todos os isolados avaliados neste trabalho.

A multirresistência bacteriana a antibióticos é um grande e crescente problema de saúde pública, em virtude da ineficiência dos protocolos de tratamento frente a doenças bacterianas, dos impactos econômicos decorrentes de gastos hospitalares, refletindo no aumento das taxas de morbidade e letalidades dessas doenças (DE CARVALHO et al., 2021). Os tratamentos de mastites, realizados de forma não controlada ou sem o estabelecimento do diagnóstico do agente etiológico e sua susceptibilidade antimicrobiana, podem ser um fator que predispõe a seleção de *S. aureus* resistentes (MORITZ; MORITZ, 2016; SOUZA et al., 2020).

O número elevado de cepas de *S. aureus* com resistência à clindamicina (66,67% dos isolados) também foi demonstrado por da Costa; Nascimento; Silva Júnior (2018) ao analisar peixes comercializados em feiras públicas no município de Macapá. Também no norte do Brasil Marques (2014), avaliou a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* isolados a partir de QMF, contudo, a taxa de resistência à clindamicina foi de 12,9%.

## CONCLUSÃO

O *S. aureus* é a principal espécie de ECP em queijos tipo Minas Frescal clandestinos comercializados no norte do Tocantins, potencialmente por ser o principal agente etiológico em casos de mastite, produção com leite cru e não manipulado de forma higiênica. Todos os isolados demonstraram potencial lipolítico em condição mesófila e psicotrófica, podendo também influenciar na qualidade sensorial e vida útil do produto. Além disso, a maioria dos isolados avaliados mostraram-se multirresistentes aos princípios antimicrobianos. O grupo dos aminoglicosídeos se mostrou o mais eficaz dos antimicrobianos avaliados, enquanto a clindamicina, do grupo das lincosamidas, foi a que demonstrou maior taxa de ineficiência sobre as bactérias do presente trabalho.

Dessa forma, os queijos tipo minas frescal, comercializados na no norte do estado do Tocantins são impróprios para o consumo, já que as amostras possuíam contagens elevadas de ECP e foram isoladas cepas com potencial toxigênico, podendo comprometer à saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, Amanda Laryssa et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2014.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- ALGHARIB, S. A.; DAWOOD, A.; XIE, S. Nanopartículas para o tratamento da mastite por *Staphylococcus aureus* bovina. **Drug delivery**, v. 27, n. 1, pág. 292-308, 2020.
- ANDRADE JÚNIOR, Francisco et al. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 2019.
- BAGLINIÈRE, François et al. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 38-45, 2017.
- BAUER, Alfred et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BEERENS, H.; LUQUET, F. M. Practical guide for microbiological analysis of milk and dairy products. **Zaragoza: Editorial Acríbia SA**, 1990.
- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle, **Foodborne bacterial pathogens** (pp. 463-523). New York: Marcel Dekker, 1989.
- BOAS, Andressa et al. Qualidade microbiológica de queijos minas frescal artesanais e industrializados. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 83536-83552, 2020.
- BONSAGLIA, Erika Carolina Romão. **Caracterização molecular e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica no estado de São Paulo**. 2016. Dissertação (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia dos Micro-organismos) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 4, de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de março de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 01 de julho de 2020.

CAMARGO, Anderson Carlos et al. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393-409, 2021.

CAMPOS, João Victor et al. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. em queijos “Minas Frescal” feitos a partir de leite cru e comercializados no município de Formiga-MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 13, p. 1-5, 2021.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 07-10, 2000.

COSTA, Geraldo Márcio et al. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 403-406, 2010.

COSTA, Geraldo Márcio da et al. Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 584-588, 2011.

COSTA, A. L. P.; NASCIMENTO, J. F.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Sa. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **PubVet**, v. 12, p. 172, 2018.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania, 2020.

CARVALHO, Juliana Jeanne et al. Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e58810616303-e58810616303, 2021.

FORSYTHE, Stephen. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed. 2000. 126p.

FORSYTHE, Stephen. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. p 274.

NADER FILHO, A. et al. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1316-1318, 2007.

GASPAROTTO, Paulo Henrique et al. Principais gêneros bacterianos causadores de mastite isolados no Laboratório de Microbiologia Veterinária na Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná-RO. **Vet. Foco**, p. 60-74, 2016.

HAAG, A. F.; FITZGERALD, J. R.; PENADÉS, J. R. *Staphylococcus aureus* in Animals. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 7-11, 2019.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 409-411, 1990.

ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species) – Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium, **International Organization for Standardization**, 1:2003.

LEE, Shi et al. Caracterização de isolados de *Staphylococcus aureus* no leite e no ambiente de ordenha de pequenas propriedades leiteiras de São Paulo, Brasil, usando eletroforese em gel de campo pulsado. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, pág. 7377-7383, 2012.

LUZ, Isabelle. Molecular characterization of toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and "coalho" cheese in cities from the Agreste region of Pernambuco. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 140-140, 2009.

MADHAIYAN, M.; WIRTH, J. S.; SARAVANAN, V. S. Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5926-5936, 2020.

MARQUES, Leila Márcia Peres. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas frescal**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde) - Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2014.

MEDEIROS, Maria Izabel et al. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 98-105, 2013.

MEHROTRA, Manisha et al. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MISIC, Ana et al. The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2015.

MORITZ, Fábio; MORITZ, Cristiane. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2016.

NOEL, Caroline et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de "slime" de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na região sul-fluminense. **Revista de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 22-26, 2016.

OLIVEIRA, Monike et al. Hygienic-health quality and microbiological hazard of clandestine Minas Frescal cheese commercialized in north Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 679-694, 2021

PATERSON, Gavin. Genomic epidemiology of the opportunistic pathogen *Staphylococcus coagulans* from companion dogs. **Journal of medical microbiology**, v. 70, n. 8, p. 001407, 2021.

PINTO, Jaqueline Becker. **Expressão e caracterização do polimorfismo genético do sistema quórum sensing AGR: suscetibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus aureus***. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2014.

RIBEIRO JÚNIOR, Jose Carlos et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2018.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos et al. Influence of the microbiological quality of raw milk on the shelf life of pasteurized milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1469-1476, 2019.

ROSSI, Bruna Fernanda. **Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica**. 2016. Dissertação - (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

SÁ, Marcos Eielson et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 321-326, 2004.

SANTIAGO, Mônica et al. **Pesquisa de *Staphylococcus Coagulase positiva produtor da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1)* em amostras de Queijo Minas artesanal**. 2019. Dissertação (Curso de Especialização em Diagnóstico e Controle Microbiológico) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SEYOUM, Eyasu et al. Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 02, p. 138-142, 2016.

SILVA, J. G.; ALCÂNTARA, A. M.; MOTA, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus spp.* resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 223-228, 2018.

SILVA, Josyane et al. Detecção de *Staphylococcus coagulase* positivo em peixes salgados e secos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 6681-6692, 2020.

SOBRAL, Denise et al. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

SOUZA, V. de et al. Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 19-23, 2015.

SOUZA, Iury Antônio et al. Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado na Zona da Mata Mineira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017.

SOUZA, Geziella Aurea et al. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 98067-98081, 2020.

TODD, James et al. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Staphylococci*. **The Lancet**, v. 312, n. 8100, p. 1116-1118, 1978.

VINHA, M. B.; OLIVEIRA, C. L. P.; CHAVES, J. B. P.. Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 62-72, 2018.

ZAATOUT, N.; AYACHI, A.; KECHA, M. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1102-1119, 2020.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho foi possível determinar as principais espécies de ECP presentes nas amostras de QMF avaliadas. Através da abordagem molecular foi possível determinar o potencial toxigênico dos *S. aureus* avaliados de forma segura. Através da análise do potencial de deterioração demonstrou que as bactérias em questão, pode-se interferir negativamente na qualidade e vida útil deste produto. A análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana permitirá embasar protocolos terapêuticos frente a infecções causadas por *S. aureus* na região.

Frente resultados demonstrados pelo presente trabalho, cabe aos órgãos de vigilância em saúde e fiscalização sanitária a adoção de práticas de conscientização dos consumidores a saberem identificar e rejeitar produtos clandestino e a restrição ao comércio desse produto. Além disso, políticas públicas voltadas para aos pequenos produtores, a fim de capacitá-los para a produção e regularização dos produtos junto aos órgãos fiscalizadores, precisam ser implementadas.