UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

ANA LUIZA DA SILVA APARECIDA

CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE PRODUÇÃO ARTESANAL

BRASÍLIA, 2024

ANA LUIZA DA SILVA APARECIDA

CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE PRODUÇÃO ARTESANAL

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. MSc. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Co-orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Aparecida, Ana Luiza da Silva.
AA639c CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE Staphylococcus aureus EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE PRODUÇÃO ARTESANAL / Ana Luiza da Silva Aparecida; orientador Letícia Rodrigues; co-orientador Daniela Orsi. -- Brasília, 2024.
42 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2024.

1. staphylococcus aureus. 2. Staphylococcus aureus E AS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. 3. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (coA, sea e seb) E DO GENE DE RESISTÊNCIA A METICILINA (mecA) EM Staphylococcus aureus. I. Rodrigues, Letícia, orient. II. Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

ANA LUIZA DA SILVA APARECIDA

CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE PRODUÇÃO ARTESANAL

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Mestre Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCTS – Universidade de Brasília)

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCTS – Universidade de Brasília)

Farmacêutica Mestre Carla Azevedo Bilac
(FCTS – Universidade de Brasília)

Farmacêutica Esp. Rebeca Dias dos Santos
(FCTS – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2024

AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu não faria agradecimentos, mas após o término da escrita percebi o quão injusto seria deixar de fora aqueles que me ajudaram durante todo o processo, portanto desde já agradeço a todos que torceram por mim.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por ter me dado tamanha graça para continuar nos piores dias.

E em segundo lugar, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho de conclusão de curso.

Agradeço imensamente aos meus pais, que me proporcionaram a oportunidade única de dedicar-me exclusivamente aos estudos, sem a preocupação de outras responsabilidades. A vocês devo a base sólida que me permitiu chegar até aqui. E a minha irmã, Duda, que sempre me recebia com um abraço, independente do dia. E em especial, minhas cachorras, que me deram motivação para nunca desistir.

A minha tia Shirley, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo apoio emocional nos momentos de dificuldade, e à minha prima Elaine, cuja presença acolhedora e palavras de incentivo foram fundamentais ao longo dessa jornada.

Agradeço também às minhas amigas Giovana, Lorena e Thaiene, que me ajudaram em diversos momentos da faculdade, seja com apoio acadêmico ou emocional. A amizade de vocês foi essencial para superar os desafios dessa caminhada.

Por fim, quero agradecer ao meu namorado, que esteve presente em todas as etapas do meu percurso, me apoiando nas minhas escolhas e sempre acreditando em mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a todos do laboratório, especialmente à Dra. Letícia, por me receber de braços abertos para realizar meu TCC e por compartilhar tanto conhecimento em genética molecular. Sua orientação foi essencial para meu aprendizado e crescimento acadêmico. À Rebeca, que sempre esteve disposta a ajudar, mesmo quando suas próprias tarefas eram inúmeras. Sua generosidade e paciência foram fundamentais para mim. A Dra. Dani, pela gentileza com que me recebeu, e à Mestre Carla, que sempre se mostrou disponível e prestativa quando precisei de apoio.

RESUMO

No Brasil, a comercialização dos queijos do tipo Minas Frescal de fabricação artesanal é muito comum, mas quando esses queijos são produzidos com leite cru ou com baixo controle de qualidade, frequentemente ocorre a contaminação por microrganismos patogênicos. A presença elevada da bactéria *Staphylococcus aureus* nesses queijos é um indicativo de erros durante a produção, que vão desde a falta de higiene até o armazenamento em temperatura inadequada, podendo ocasionar intoxicação alimentar no consumidor. O principal objetivo neste estudo foi a detecção dos genes de virulência (*coA, sea* e *seb*) e do gene de resistência a meticilina (*mecA*) em 30 cepas suspeitas de *S. aureus* isoladas a partir de cinco amostras de queijos Minas Frescal artesanal comercializados em feiras permanentes do Distrito Federal. Para isso foi realizado o isolamento e a extração do DNA das cepas suspeitas de *S. aureus*. A amplificação do material genético foi realizada pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a confirmação genética das cepas de *S. aureus*, foi utilizado o gene de virulência *coA* (que codifica a enzima coagulase). Adicionalmente, foram buscados os genes de virulência *sea* e *seb* que codificam enterotoxinas estafilocócicas e o gene de resistência a meticilina *mecA*. Das 30 cepas analisadas, 19 cepas (63,3%) apresentaram o gene *coA* e foram confirmadas como *S*. *aureus* e as outras 11 cepas (36,7%) foram classificadas como Staphylococcus coagulase negativas. O gene *mecA* foi encontrado em 3 cepas (10%), sendo 2 cepas coagulase positivas (*S. aureus*) e 1 cepa coagulase negativa. Em relação as enterotoxinas estafilocócicas, 12 cepas (40%) apresentaram o gene *sea* (8 cepas coagulase positivas (S. aureus) e 4 cepas coagulase negativas) e nenhuma cepa apresentou o gene *seb*. Assim, esse estudo mostrou que os queijos de produção artesanal estavam contaminados com cepas de *S. aureus* e Staphylococcus coagulase negativas portando genes de enterotoxina estafilocócica e de resistência a meticilina. A presença de genes de toxinas e de resistência antimicrobiana nesses queijos podem representar risco à saúde pública pela circulação de patógenos através desses produtos.

Palavras-chave: lacticínios, Staphylococcus coagulase positiva, gene *coA*, gene *sea*, gene *mecA*, coagulase, enterotoxina estafilocócica, resistência a meticilina

ABSTRACT

In Brazil, the commercialization of artisanal Minas Frescal cheese is very common. However, when these cheeses are produced using raw milk or with poor quality control, contamination by pathogenic microorganisms often occurs. The high prevalence of the bacterium *Staphylococcus aureus* in these cheeses indicates production errors, ranging from poor hygiene practices to inadequate temperature storage, which can lead to food poisoning in consumers. The main objective of this study was to detect virulence genes (*coA, sea,* and *seb*) and the methicillin resistance gene (*mecA*) in 30 suspected *S. aureus* strains isolated from five samples of artisanal Minas Frescal cheese sold at permanent markets in the Federal District. The study involved isolating and extracting DNA from the suspected *S. aureus* strains. Genetic material amplification was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. For genetic confirmation of *S. aureus* strains, the virulence gene *coA* (encoding the coagulase enzyme) was targeted. Additionally, the study screened for the virulence genes *sea* and *seb*, which encode staphylococcal enterotoxins, as well as the methicillin resistance gene *mecA*. Among the 30 strains analyzed, 19 (63.3%) were confirmed as S. aureus by the presence of the *coA* gene, while the remaining 11 (36.7%) were classified as coagulase-negative staphylococci. The *mecA* gene was identified in 3 strains (10%), including 2 coagulase-positive strains (*S. aureus*) and 1 coagulase-negative strain. Regarding staphylococcal enterotoxins, the *sea* gene was detected in 12 strains (40%), comprising 8 coagulase-positive (*S. aureus*) strains and 4 coagulase-negative strains. The seb gene was not found in any of the strains. This study demonstrated that artisanal cheeses were contaminated with both *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci carrying staphylococcal enterotoxin and methicillin resistance genes. The presence of toxin and antimicrobial resistance genes in these cheeses poses a public health risk due to the potential circulation of pathogens through these products.

Keywords: dairy products, coagulase-positive *Staphylococcus*, *coA* gene, *sea* gene, *mecA* gene, coagulase, staphylococcal enterotoxin, methicillin resistance

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados para identificação dos genes *coA, mecA, sea* e *seb* 22
Quadro 2 – Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase 23
Quadro 3 – Identificação dos genes de virulência (*coA, sea* e *seb*) e do gene de resistência a meticilina (mecA) nas cepas de Staphylococcus coagulase positivas e negativas isoladas de queijos de produção artesanal.....26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência de identificação do gene coagulase *coA* e do gene de resistência a meticilina *mecA* em cepas suspeitas de *S. aureus* isoladas a partir de queijos de produção artesanal.....22

Gráfico 2 – Frequência de identificação dos genes *sea* e *seb* em cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas isoladas a partir de queijos de produção artesanal.....23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia da bactéria *Staphylococcus aureus* 13
Figura 2 – *Staphylococcus aureus* em produtos lácteos 15
Figura 3 – Fluxograma dos fatores de contaminação em uma cadeia produtiva de laticínios 17
Figura 4 – Interações bacterianas com as membranas mucosas 18
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose à 1,5% com a detecção dos genes *coA*, *mecA* e *sea* para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos de produção artesanal.....30

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

LOCUS AGR	Locus accessory gene regulador
SE	Enterotoxinas Estafilocócicas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MRSA	Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
DTAH	Doenças de Transmissão Hídricas e Alimentares
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
coA	Gene de Resistência que codifica a enzima coagulase
mecA	Gene de Resistência que codificar a proteínas de ligação à penicilina
sea	Gene de Virulência da enterotoxina tipo A
seb	Gene de Virulência da enterotoxina tipo B
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Pb	Pares de base
CN	Controle Negativo
S. aureus	Staphylococcus aureus
DF	Distrito Federal
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
TAQ	Enzima usado na biologia molecular para amplificar o DNA
mL	Mililitros
Pmol	Unidade de medida equivalente a uma bilionésima de mol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
U/µL.	Unidade de massa atômica por microlitro
MM	Milimolar
Ng	Nanograma
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
F	Foward
R	Reverse
N	Negativo
P	Positivo
seQ	Gene de Virulência da enterotoxina tipo A
clfA	Fator de aglutinação A
clfD	Fator de aglutinação D

tsst-1	Gene da toxina da síndrome do choque tóxico-1
icaA	Gene de adesão intracelular A
icaD	Gene de adesão intracelular D
hla	Gene das toxinas hemolisinas A
hlb	Gene das toxinas hemolisinas B
hld	Gene das toxinas hemolisinas D
Y-hlg	Gene das toxinas hemolisinas G
mecC	Gene que codifica resistência a medicamentos C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 REVISÃO DA LITERATURA 16

2.1 *Staphylococcus aureus* 16

2.2 *Staphylococcus aureus* E AS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E 17

ALIMENTAR 17

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (*coA*, *sea* e *seb)* E DO GENE DE RESISTÊNCIA A METICILINA (*mecA)* EM *Staphylococcus aureus* 21

3 OBJETIVOS 23

3.1 OBJETIVO GERAL 23

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

4 JUSTIFICATIVA 24

5 MÉTODOS 25

5.1 COLETA DE AMOSTRAS 25

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES ... 25

5.3 ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO 25

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28

7 CONCLUSÃO 35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1 INTRODUÇÃO

O leite é o principal alimento dos mamíferos durante os primeiros meses de vida, ele é produzido pelas fêmeas das espécies e dada às suas proles. No entanto, os seres humanos possuem uma peculiaridade, após se tornarem adultos, continuam ingerindo leite e seus derivados (Sagiorato et al., 2015).

Para a produção do queijo Minas Frescal são necessárias poucas matérias-primas, sendo elas o leite de vaca, o coalho (que são as enzimas quimiosina e pepsina que causam a coagulação do leite) e fermento lático (Oliveira *et al*., 2019). A qualidade do queijo depende diretamente da qualidade do leite e como o queijo Minas Frescal não passa por processo de maturação é obrigatório o uso de leite pasteurizado para sua produção (Sagiorato *et al*., 2015).

Entretanto, muitos produtores de queijo Minas Frescal utilizam o leite cru na sua fabricação. O leite cru pode apresentar em sua composição microrganismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Salmonela* spp. e *Staphylococcus aureus* (Pineda *et al.*, 2023; Pulingam *et al.*, 2021). A bactéria *S. aureus* é o mais comum agente causador da mastite, doença que afeta os bovinos e pode contaminar o leite (Amanzholova *et al*., 2024).

A bactéria *S. aureus* produz vários fatores de virulência, como adesinas e enterotoxinas estafilocócicas, que contribuem para a patogenicidade e aumentam a capacidade dessas bactérias em fugir das respostas imunes dos hospedeiros (Nikolic, e Mudgil, 2023; Singh e Ujjal, 2019). As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são um fator de virulência de *S. aureus* e 24 tipos diferentes de SEs já foram identificados, entretanto, apenas cinco foram estudadas de maneira suficiente para serem definidas, sendo elas: sea, seb, sec, sed e see (Grispoldi *et al*., 2021).

A bactéria *S. aureus* desenvolveu resistência a muitos antibióticos, dificultando a eficácia do tratamento das infecções (Nikolic e Mudgil, 2023). Os antimicrobianos β-lactâmicos atuam ligando-se a proteínas envolvidas na síntese da parede celular, conhecidas como PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), o que impede a formação da parede celular e causa a lise das bactérias. A resistência de *S. aureus* à meticilina é devido ao desenvolvimento de uma PBP nova que, apesar de ser funcional, não tem afinidade pelos antimicrobianos β-lactâmicos. Essa nova PBP é codificada pelo gene *mecA*, adquirido pela bactéria (Eid *et al*., 2022; Fishovitz *et al.*, 2014).

A identificação dos genes de virulência e de resistência do *S. aureus* é possível

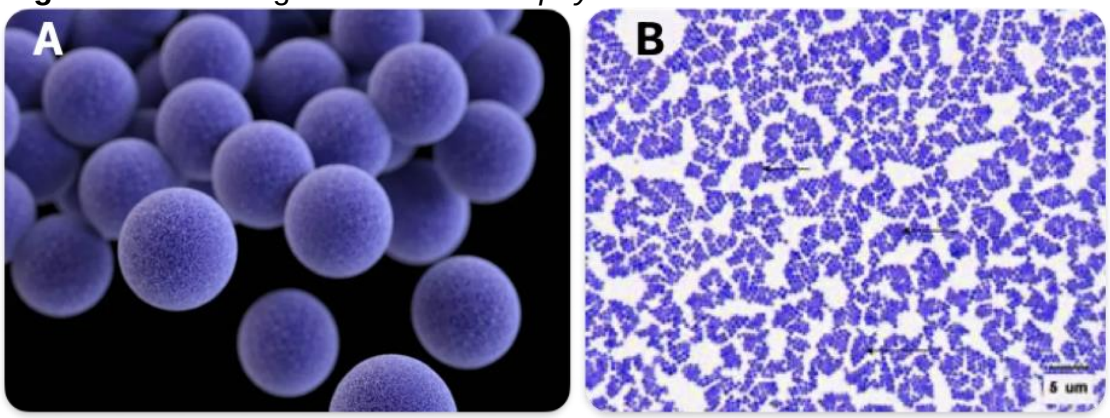
por meio de confirmação genética, técnica que implica no isolamento da bactéria e na subsequente extração de seu DNA. Diversos métodos de extração de DNA estão disponíveis, no entanto, em todos os métodos, é indispensável a lise da bactéria e a purificação do material genético (Masihinejad *et al*., 2023).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* é Gram-positiva, de morfologia cocos e agrupada em cachos (Figura 1). Essas bactérias crescem em aerobiose ou anaerobiose facultativa, entre 7 e 46°C, e suportam o congelamento até -20°C. As bactérias *S. aureus* também conseguem sobreviver em altas concentrações de NaCl (até 20%) (Órgão da Polícia Criminal, 2020). Podem ser formadoras de colônias pigmentadas (amarelas) ou colônias brancas, com tamanhos que variam de 0,5 a 1,5 µm, são catalase positiva e coagulase positiva ou negativa (Luz, 2008).

Figura 1 – Morfologia da bactéria *Staphylococcus aureus.*



Fontes: CDC, Jeniffer Oosthuizen e Scott Jones, MD.
Legenda: **A** - Imagem computadorizada 3D, por meio de microscopia eletrônica de varredura, de uma bactéria *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina. B - Coloração de Gram da Bactéria *Staphylococcus aureus em microscopia de 100x.*

A bactéria *S. aureus* é um dos agentes infecciosos mais comuns entre humanos e animais e é responsável por causar desde infecções cutâneas, doenças alimentares e até infecções mais complicadas como pneumonias e sepses (Cheung *et al*., 2021; Keim *et al.* 2023). Em condições favoráveis (presença de oxigênio, pH entre 5,2 e 9,0 e temperatura entre 10 e 45°C), certas cepas de *S. aureus* podem produzir toxinas responsáveis por intoxicações alimentares (Órgão da Polícia Criminal, 2020). Essa bactéria também é a responsável por ser o agente infeccioso mais comum causador da mastite em bovinos (Morales-Ubaldo *et al*., 2023). *S. aureus* é considerada uma bactéria de fácil disseminação e sua transmissão pode ocorrer por gotículas de saliva, contato direto e compartilhamento de objetos e alimentos (Monteiro-Julian, 2020).

A resistência à antibióticos nas infecções causadas por *S. aureus* é comum, sendo a resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos uma das mais disseminadas na espécie (MRSA, sigla em inglês para *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (Zaatout *et al*., 2020).

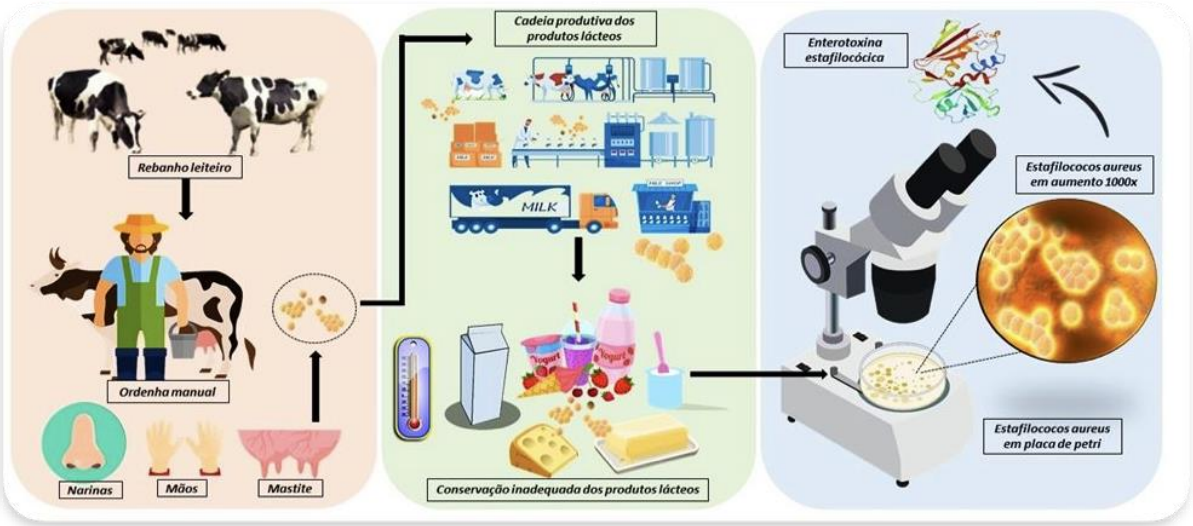
2.2 *Staphylococcus aureus* E AS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR

As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são aquelas cuja infecção ao hospedeiro advém de ingestão de água e alimentos previamente contaminados por microrganismos patogênicos (Coelho, 2022). A bactéria *S. aureus* pode ser encontrada tanto em águas doces, como em águas salgadas e salobras, devido a sua capacidade de sobrevivência em altas concentrações de NaCl (Steadmon *et al*., 2023; Órgão da Polícia Criminal, 2020).

A contaminação por *S. aureus* em produtos lácteos pode ocorrer tanto por meio dos animais quanto dos seres humanos, já que ambos podem ser portadores da bactéria. Dessa forma, se não houver o controle de higiene e temperatura do leite, a probabilidade de contaminação em produtos lácteos é alta (Grispoldi *et al.*, 2021).

Assim, alguns alimentos são mais suscetíveis a causar intoxicações estafilocócicas, como os de origem bovina (leite, queijos e derivados lácteos), visto que o animal tem a possibilidade de ter sido afetado pela mastite bovina (Huang *et al*., 2021). A representação desse processo é apresentada na Figura 2.

Figura 2 – *Staphylococcus aureus* em produtos lácteos.



Fonte: NASCIMENTO *et al*., 2023.

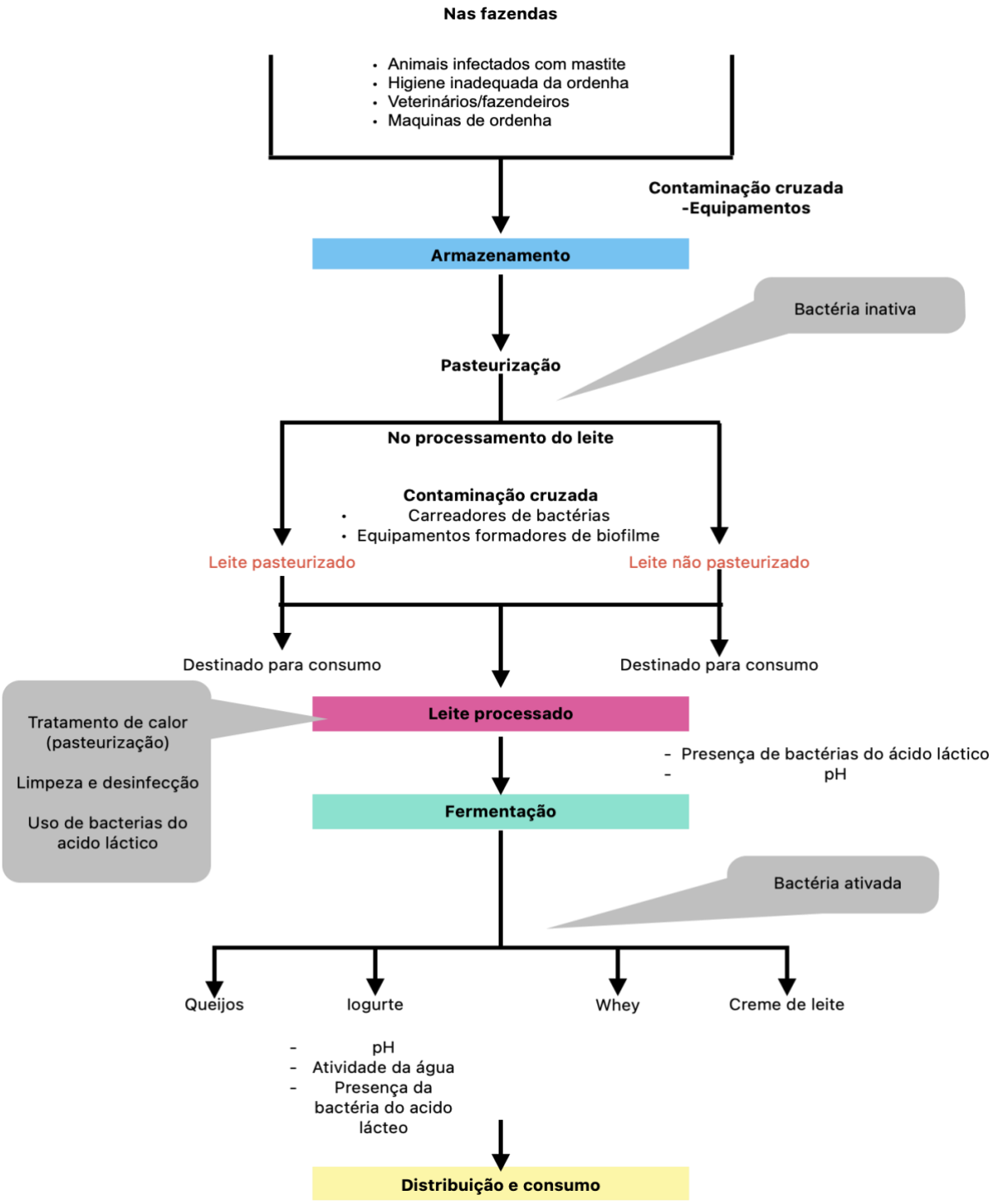
Legenda: Primeiro quadrante: ordenha do rebanho de forma manual, onde há possibilidade de infecção direta, entre as mãos do produtor e o úbere da vaca. Segundo quadrante: cadeia produtiva de lacticínios e os erros de sua conservação. Terceiro quadrante: observação das características morfotintoriais em microscópio com aumento de 1000x.

Os sintomas da intoxicação alimentar causada por *S. aureus* dependem da quantidade de toxinas ingeridas, podendo aparecer sintomas a partir da ingestão de 0,1 µm. Se houver a ingestão de, minimamente, 105 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. aureus* por grama de alimento, é maior a possibilidade de sintomas como vômitos e náuseas (Órgão da Polícia Criminal, 2020). Essas intoxicações alimentares não costumam durar mais que 48 h, sendo a necessidade de hospitalização baixa (Huang *et al*., 2021).

A mastite bovina é uma doença que pode ser causada por agentes que habitam as glândulas mamárias e pele dos bovinos (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*) ou causada por bactérias encontradas no meio ambiente (*Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). A infecção pode ser classificada de duas formas: ascendente, isto é, quando o transmissor da bactéria é externo ao animal (mãos do ordenhador, é um exemplo), ou endógena, onde os agentes infecciosos são comumente encontrados nas mamas da vaca, se alojam e levam à infecção (Governo do Estado de São Paulo, s.d.).

A bactéria *S. aureus* é uma das principais encontradas em produtos de origem láctea bovina, devido à contaminação do leite das vacas. Os maiores casos de intoxicações estafilocócicas estão relacionados a queijos fabricados com leite que não passou pelo processo de pasteurização (Oliveira *et al*., 2022). Animais infectados com mastite, higiene imprópria, fazendeiros e veterinários infectados fazem parte do ciclo de contaminação do leite com *S. aureus* (Titouche *et al*., 2022). Na Figura 3, é possível identificar cada uma dessas etapas.

Figura 3 – Fluxograma dos fatores de contaminação em uma cadeia produtiva de laticínios.



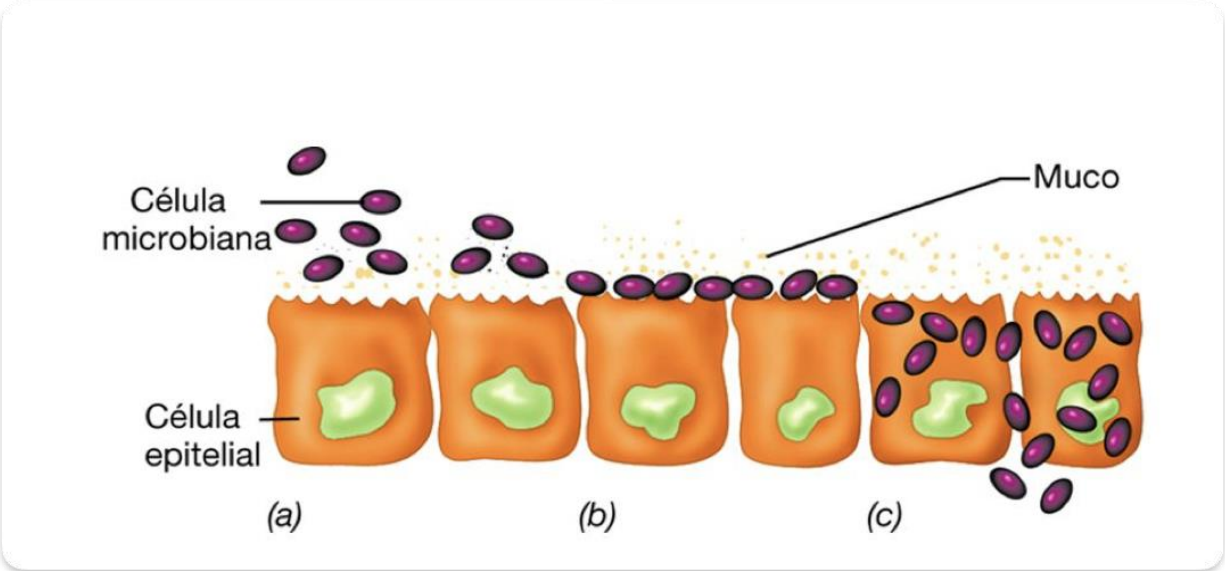
Fonte: Titouche *et al*., 2022.

Legenda: Traduzido e adaptado. Risk factors of MRSA transmission and preventive measures in dairy production chain.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA (*coA*, *sea* e *seb)* E DO GENE DE RESISTÊNCIA A METICILINA (*mecA)* EM *Staphylococcus aureus*

As bactérias *S. aureus* possuem estratégias multifatoriais (aderência, sobrevivência, evasão e invasão) chamadas de Fatores de Virulência (Figura 4) (Pinto, 2014). A maior parte dos genes de virulência da bactéria *S. aureus* possuem o *locus agr* (locus acessory gene regulador), que tem atividade de *quorum-sensing* (percepção bacteriana da densidade celular do meio) que regulam os fatores de adesão da bactéria. Um exemplo desses fatores é a produção de uma barreira de proteção, chamada de biofilme, que causa uma resistência da bactéria a antibióticos (Favilla, 2017).

Figura 4 - Interações bacterianas com as membranas mucosas.



Fonte: Madigan *et al*, 2016.
Legenda: (a): associação frouxa: primeiro contato da bactéria com a célula. É uma ligação fraca, utilizada para prosseguir com a adesão. (b): adesão: consiste em uma ligação forte e irreversível entre a bactéria e a célula, realizada pela proteína adenina; (c): invasão: estágio final da contaminação, onde a bactéria penetra na célula.

Os diferentes fatores de virulência presentes na bactéria *S. aureus* dependem do tipo de gene expressado. O gene *sea* por exemplo é responsável por causar 80% das intoxicações alimentares nos Estados Unidos. Esse gene é uma das exceções das enterotoxinas não reguladas pelo *locus agr* e seu mecanismo de ação se dá por meio de um vetor bacteriófago. Já o mecanismo de ação do gene *seb* ocorre em cromossomos (Al-Zamily *et al*., 2020).

O gene codificador de produção de coagulase (gene *coA*) é um dos mais usados para detecção de *S. aureus* em alimentos (Turco, 2013), sendo relacionado a produção da enzima coagulase que causa a coagulação plasmática, e essa característica de coagulase positiva é um indicativo de *S. aureus* causador de infecções (Effendi *et al*., 2019).

Outro gene bastante estudado em *S. aureus* é o *mecA*, que codifica a proteína PBP2a, criando uma maneira de proteger a bactéria dos antimicrobianos beta-lactâmicos, mesmo em doses altas. Essa estratégia se dá ao fato de que a PBP2a possui pouca afinidade com os beta-lactâmicos, então a parede celular continua sendo sintetizada (Eid *et al*., 2022; Fishovitz *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a presença de genes de virulência (*coA*, *sea* e *seb*) e do gene de resistência a meticilina (*mecA*) em cepas suspeitas de *S. aureus* isoladas de queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal comercializados no Distrito Federal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença do gene de virulência *coA* (gene que codifica a enzima coagulase) e dos genes de virulência *sea* e *seb* (gene codificadores de produção de enterotoxinas estafilocócicas) nos isolados suspeitos de S*. aureus*;

- Avaliar a presença do gene de resistência a meticilina (*mecA*) nos isolados suspeitos de *S. aureus.*

4 JUSTIFICATIVA

O consumo de queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal é muito comum no Brasil, e, portanto, cabe avaliar os riscos presentes nesses alimentos, que podem estar contaminados por microrganismos como *S. aureus*, um agente infeccioso que causa mastite bovina, e que pode causar intoxicações alimentares em humanos. Assim, é de suma importância identificar, por meio de confirmação genética, genes de virulência (*coA*, *sea* e *seb*) e genes de resistência antimicrobiana em cepas de *S. aureus* isoladas de queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal comercializados no Distrito Federal.

5 MÉTODOS

5.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram analisadas 30 cepas suspeitas de *S. aureus*, que foram isoladas a partir de 5 amostras de queijos do tipo Minas Frescal de produção artesanal, coletados em feiras permanentes do Distrito Federal no período de fevereiro de 2019 a novembro de 2020. Para o isolamento de *Staphylococcus*, as amostras de queijos foram diluídas e plaqueadas em meio de cultivo seletivo (ágar padrão para contagem suplementado com 6% de cloreto de sódio), considerando que as bactérias do gênero *Staphylococcus* toleram altas concentrações salinas. As colônias resultantes foram isoladas em tubos Falcon contendo ágar sal manitol e submetidos a coloração de Gram. As colônias fermentadoras de manitol e com morfologia de cocos agrupados em cachos e Gram-positivas foram consideradas isolados suspeitos de *S. aureus*.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi realizado o preparo das amostras, que consistiu em cultivar por 16-24 h as colônias das bactérias isoladas em caldo LB. A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit Purelink Genomic DNA® Mini Kit Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific (Lote n° 1888413 - Catálogo n° K18 01), seguindo o protocolo do fabricante para extração de bactérias Gram- negativas. Após o processo de extração a qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas pela quantificação no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA). Os produtos foram diluídos com água MiliQ® para concentração média de 20 ng/µL, e seguiram para a eletroforese em gel de agarose.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES: AMPLIFICAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Para a confirmação genética das cepas suspeitas de *S. aureus*, foram utilizados o gene de virulência *coA* que codifica a enzima coagulase e os genes de virulência *sea* e *seb* que são codificadores de toxinas. Também foi pesquisado o gene de resistência antimicrobiana *mecA* (responsável por codificar proteínas de ligação à

penicilina da parede celular) (Fishovitz *et al*., 2014). As análises moleculares foram conduzidas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um procedimento laboratorial destinado a amplificar curtas sequências de DNA da região genômica selecionada. Essa abordagem permite a amplificação de múltiplas cópias do material genético pesquisado, possibilitando sua visualização. As sequências de oligonucleotídeos estão descritas no Quadro 1. As sequências dos oligos utilizados para identificação dos genes de virulência *coA* e *mecA* e para os genes de toxicidade *sea* e *seb* estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados para identificação dos genes *coA, mecA, sea* e *seb.*

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho(pb)	Referência
coA	F: ATAGAGATGCTGGTACAGG R: GCTTCCGATTGTTCGATGC	350 430 570 630	(EID *et al*., 2022)
mecA	F: GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	(EID *et al*., 2022)
sea	F: GGTTATCAATGTGCGGGTGG R: CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102 771	(EID *et al*., 2022 e BALABAN, 2000)
seb	F: GTATGGTGGTGTAACTGAGC R: CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	(EID *et al*., 2022)

Fonte: EID *et al*., 2022 e BALABAN, 2000.
Legenda: F: *foward* (5′→3′); R: *reverse* (5′→3′); pb: pares de base.

As condições de ciclagem para análise dos genes *sea* e *seb* foram de 94°C por cinco minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 egundos também por 94°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C, e incubação final de quatro minutos a 72°C. Para análise do gene *mecA*, foi utilizada a seguinte programação: 94°C por cinco minutos, seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 57°C, um minuto a 72°C, e incubação final de quatro minutos a 72°C (Dias *et al*., 2011). Para o gene *coA* foram utilizadas as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e por fim, 72°C por 10 minutos (Turco, 2013).

A amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando os termocicladores Life Express Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b), Swift MiniPro Thermal Cycler modelo SWT-MIP-0-2-1 e Life Touch Thermal Cycler modelo TC~96/G/H(b)B.

Em cada reação foram usadas quantidades padronizadas dos reagentes para o protocolo de identificação dos genes *coA*, *mecA*, *sea* e *seb*, que podem ser visualizados no Quadro 2. Todas as reações foram completadas com água ultrapura para um volume final de 25 µL por reação.

Quadro 2 - Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

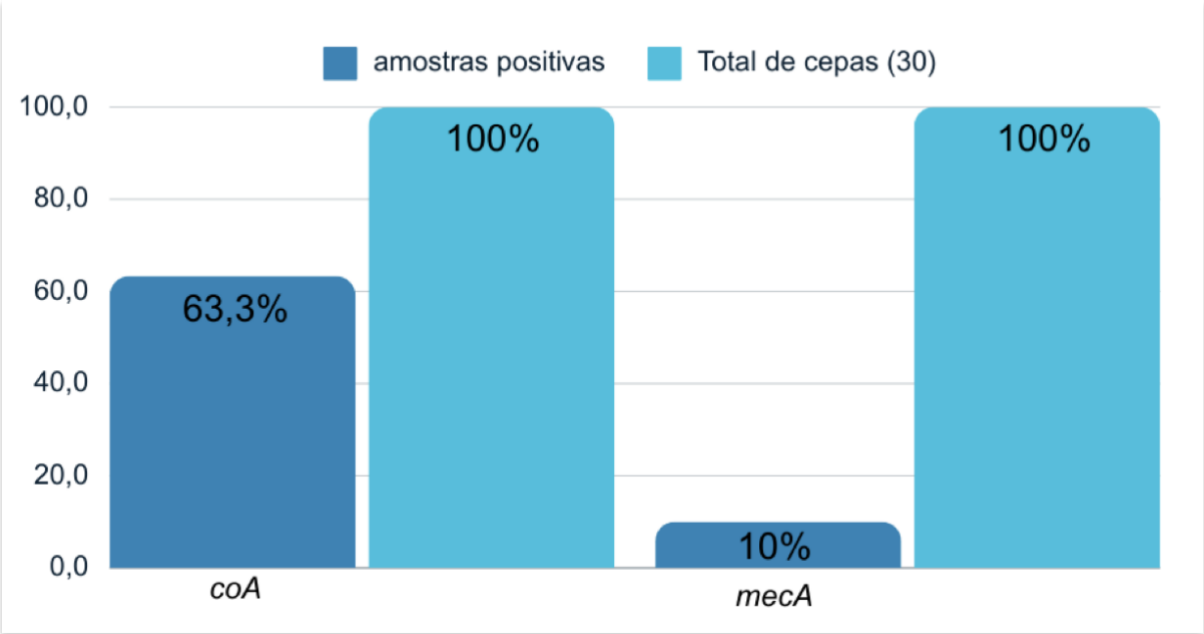
Reagente	**Concentração final**	***coA* (µL)**	***mecA* (µL)**	***sea* (µL)**	***seb* (µL)**
Água MiliQ®	q.s.p 25 µL	72	69,2	72	60,2
Tampão Taq	10x	12,5	12,5	12,5	12,5
$MgCl_2$ (mM)	50 mM	6,3	6,3	6,3	6,3
dNTP (mM)	2,5 mM	6,3	10	6,3	10
Oligo *F* (µM)	10 pmol/µL	2,5	2,5	2,5	2,5
Oligo *R* (µM)	10 pmol/µL	2,5	2,5	2,5	2,5
Taq DNA pol (U/µL)	5 U/ µL	2	2	2	2
DNA molde	2,4 ng	0,8	0,8	0,8	0,8

Fonte: Autoria própria (2024).
Legenda: q.s.p: quantidade suficiente para; $MgCl_2$: Cloreto de magnésio; mM: milimolar; µM: micromolar; U/µL: unidade de massa atômica por microlitro; ng: Nanograma; µL: microlitro.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de identificação do gene coagulase *coA* e do gene de resistência a meticilina *mecA* nas cepas suspeitas de *S. aureus* isoladas a partir de queijos de produção artesanal estão apresentados no Gráfico 1. Das 30 cepas analisadas, 19 cepas (63,3%) apresentaram o gene *coA* e foram confirmadas como *S. aureus* e as outras 11 cepas (36,7%) foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativas. O gene *mecA* foi encontrado em 3 cepas (10%), sendo 2 cepas coagulase positivas (*S. aureus*) e 1 cepa coagulase negativa (Quadro 3).

Gráfico 1- Frequência de identificação do gene coagulase *coA* e do gene de resistência a meticilina *mecA* em cepas suspeitas de *S. aureus* isoladas a partir de queijos de produção artesanal



Fonte: Autoria própria, 2024.
Legenda: Frequência das amostras que foram positivas para a presença do *gene* de virulência *coA e mecA* em comparação a quantidade total de 30 cepas que foram utilizadas nos testes.

A enzima coagulase é um importante determinante fenotípico e fator de virulência de *S. aureus*, sendo utilizada para diferenciar *S. aureus* de outras espécies de estafilococos que não produzem coagulase (*Staphylococcus* coagulase negativos). Assim, essa enzima tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo e esse coágulo formado serve como proteção da bactéria ao processo de fagocitose, evadindo o sistema imune, e podendo causar abcessos (Effendi *et al*., 2019; Javid *et al*., 2018).

Javid *et al.* (2018) observaram que das 39 cepas de estafilococos isoladas do leite de animais com mastite, da cavidade nasal e da pele de bovinos na Índia, 64,4% das amostras foram positivas para o gene *coA*. Valmorbida *et al.* (2023) encontraram 90% das amostras coletadas de gados com alta taxa de infeção por *S. aureus* em São Paulo, no sudoeste do Brasil, positivas para o gene de virulência coA. Já nos achados de Godinho *et al.* (2018), as amostras foram retiradas do leite cru de búfala, e 100% delas estavam contaminadas com cepas de S. aureus que continham o gene *coA.*

A resistência de *S. aureus* à meticilina é mediada, principalmente, pela expressão do gene *mecA*, que codifica uma proteína com baixa afinidade à penicilina, tornando os antibióticos β-lactâmicos ineficientes no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* (Eid *et al.,* 2022; Fishovitz *et al.,* 2014). As cepas *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) representam uma séria ameaça à saúde pública, com crescente virulência e resistência antimicrobiana (Rashid *et al*, 2023).

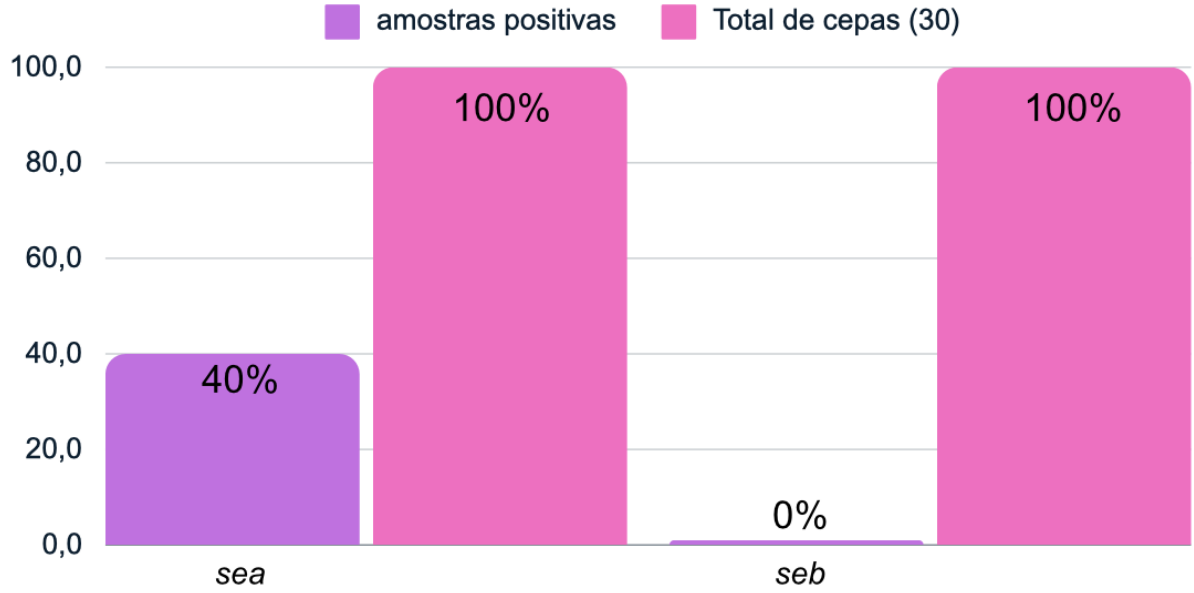
As cepas MRSA isoladas de bovinos tem sido cada vez mais relatadas, representando um risco zoonótico de transmissão a humanos (Klibi *et al*., 2018), Khairullah *et al.* (2022) através do isolamento de amostras do leite bovino de fazendas da Indonésia, confirmaram que 30% das cepas possuíam o gene *mecA*. Keyvan *et al.* (2020) identificaram cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina em leites dispostos em tanques na Turquia, onde 75,4% das amostras positivaram para o gene *mecA.*

No Gráfico 2 estão apresentados os resultados em relação à identificação dos genes de virulência *sea* e *seb* (gene codificadores de produção de enterotoxinas estafilocócicas) nas cepas de Staphylococcus coagulase positivas e negativas isoladas a partir de queijos de produção artesanal. Observou-se que 12 cepas (40%) apresentaram o gene *sea* (8 cepas coagulase positivas (*S. aureus*) e 4 cepas coagulase negativas) e nenhuma cepa apresentou o gene *seb* (Quadro 3).

As enterotoxinas produzidas por bactérias *Staphylococcus* enterotoxigênicas (SEs), como *S. aureus* são consideradas as principais causas associadas à intoxicação alimentar, com destaque para as SEs clássicas dos tipos A, B, C, D e E (Ren *et al*., 2020; Wang *et al.*, 2018). A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* coagulase negativa (como exemplo de *Staphylococcus* coagulase negativa temos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus haemolyticus*) tem sido relatada em vários estudos, e algumas espécies produtoras enterotoxinas estão envolvidas em alguns surtos esporádicos de intoxicação alimentar. Assim,

vários fatores de virulência, como os genes das enterotoxinas (SE) (*sea* a *seQ*), o gene da toxina da síndrome do choque tóxico-1 (tsst-1), os fatores de aglutinação (*clfA* a *clfD*), os genes de adesão intracelular (*icaA* e *icaD*), os genes das toxinas hemolisinas (*hla*, *hlb*, *hld*, *Y-hlg*) e os genes que codificam resistência a medicamentos (*mecA* e *mecC*), foram originalmente identificados e caracterizados no *S. aureus*, e atualmente, esses genes de virulência também têm sido detectados em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (Getahun *et al*., 2024).

Gráfico 2 – Frequência de identificação dos genes *sea* e *seb* em cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas isoladas a partir de queijos de produção artesanal



Fonte: Autoria própria, 2024.
Legenda: Em roxo, frequência das amostras que positivaram para os gens *sea e seb*, em comparação a quantidade total de cepas, em rosa, utilizadas nos testes.

O Quadro 3 apresenta a identificação dos genes de virulência (*coA*, *sea* e *seb*) e do gene de resistência a meticilina (*mecA*) nas cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas isoladas de queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal comercializados no Distrito Federal.

Quadro 3 - Identificação dos genes de virulência (*coA*, *sea* e *seb*) e do gene de resistência a meticilina (*mecA*) nas cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas isoladas de queijos de produção artesanal

Amostras	coA	mecA	sea	seb
1	N	N	P	N
2	N	N	N	N
3	P	N	N	N
4	P	N	P	N
5	P	N	N	N
6	P	P	N	N
7	P	N	N	N
8	P	N	N	N
9	P	N	N	N
10	P	N	P	N
11	N	N	P	N
12	N	N	P	N
13	P	N	P	N
14	P	N	N	N
15	N	N	N	N
16	N	N	N	N
17	P	N	N	N
18	N	N	N	N
19	P	P	P	N
20	P	N	N	N
21	N	P	P	N
22	N	N	N	N
23	P	N	N	N
24	P	N	N	N
25	N	N	N	N
26	P	N	P	N
27	N	N	N	N
28	P	N	P	N
29	P	N	P	N
30	P	N	P	N

Fonte: autoria própria, 2024.
Legenda: Resultado das 30 cepas de *Staphylococcus aureus* das 5 amostras diluídas, retiradas de queijos tipo Minas Frescal para cada gene (*coA*, *mecA*, *sea* e *seb*). P – Positivo; N – Negativo.

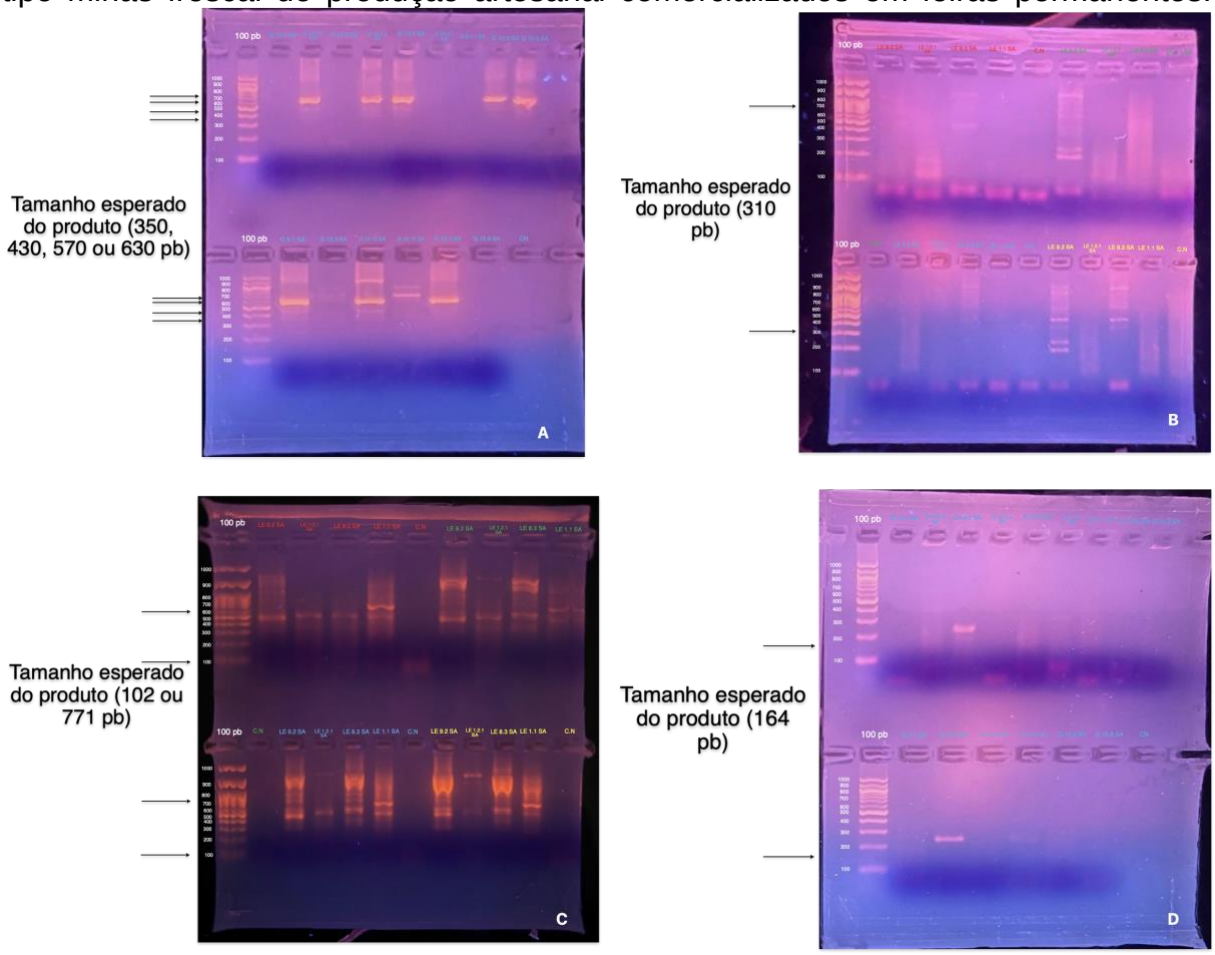
Observou-se que 7 cepas (23,3%) positivaram para os genes *coA* e *sea*, indicando serem cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas, 1 cepa positivou para os genes *coA* e *mecA*, indicando ser uma cepa de *S. aureus* resistente aos antibióticos beta-lactâmicos, 1 cepa positivou para os genes *coA*, *mecA* e *sea*, indicando ser uma cepa de *S. aureus* produtora de enterotoxinas e resistente aos

antibióticos beta-lactâmicos e 1 cepa não positivou para o gene *coA* e positivou para os genes *mecA* e *sea*, indicando ser uma cepa de *Staphylococcus* coagulase negativa produtora de enterotoxinas e resistente aos antibióticos beta-lactâmicos.

Algammal *et al*. (2020) isolaram 30 cepas de *S. aureus* de amostras retiradas do leite no Egito e 100% dos isolados tinham os genes *coA* e *mecA* e apenas 26,6% tinham o gene *sea* e não houve identificação do gene *seb.* Abd El Tawab *et al.* (2016) isolaram 11 cepas de *S. aureus* de amostras retiradas de queijos, iogurtes, sorvetes e leite em Giza, no Egito e 100% dos isolados apresentaram o gene *coA* e *mecA*, 45,45% dos isolados apresentaram o gene *sea* e não houve identificação do gene *seb.* Nazari *et al* (2014) reportaram que das 52 cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru no Irã, 30% das amostras tiveram positividade para o gene *sea*. Vieira *et al.* (2021) isolaram e confirmaram 46 cepas *S. aureus* retiradas de amostras de vacas leiteiras do centro-oeste brasileiro, onde 71,7% das cepas apresentaram o gene *coA*, 69,69% das cepas apresentaram o gene *sea*, 3% das cepas apresentaram o gene *mecA*, enquanto o gene *seb* não foi detectado. Sipahi *et al*. (2023) isolaram 27 cepas suspeitas de *S. aureus* de leite cru de bovinos e o gene de virulência *coA* positivou para 46,42% dos isolados, enquanto o gene *mecA* positivou para 15,46% dos isolados.

Os resultados da Reação de Cadeia Polimerase (PCR) para a identificação dos genes *coA*, *mecA* e *sea* podem ser visualizados na Figura 5.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose à 1,5% com a detecção do gene de virulência e toxicidade para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos do tipo minas frescal de produção artesanal comercializados em feiras permanentes.



Fonte autoria própria, 2024.
Legenda: A: gel de agarose à 1,5% com detecção do gene de virulência *coA.* B: gel de agarose à 1,5% com detecção do gene de virulência *mecA*. C: gel de agarose à 1,5% com detecção do gene de toxicidade *sea*. D: gel de agarose à 1,5% com detecção do gene de toxicidade *seb.;* pb: pares de bases; CN: controle negativo.

Polimorfismos genéticos são muito comuns entre todos os indivíduos que possuem material genético (como humanos, bactérias e vírus), essa alteração dos sítios de reconhecimento enzimático faz com que ocorram mudanças na sequência do DNA (LIMA *et al*., 2006). Essa variação genética, causa uma diferenciação dos indivíduos, mesmo que pertencendo a mesma espécie. Ela pode ser passada hereditariemente de modo parcial (Fonsêca *et al*., 2022). Por consequência, essa variedade de polimorfismos genéticos também traz variações nos Pares de Bases (pb) dos genes, e por esse motivo alguns genes possuem mais de um par de base, como os genes *coA* e *sea,* portanto, a utilização de múltiplos genes otimiza a identificação mais precisa na comparação das mutações de um microorganismo.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que os queijos do tipo Minas frescal de produção artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal estavam contaminados com cepas de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativas portando genes de enterotoxina estafilocócica e de resistência à meticilina. A presença de genes de toxinas e de resistência antimicrobiana nesses queijos podem representar risco à saúde pública pela circulação de patógenos através desses produtos. Assim, sugere-se que o queijo artesanal seja produzido com maior controle sanitário e uso de leite pasteurizado para oferecer qualidade e segurança alimentar ao consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL TAWAB, A. A. *et al*. Bacteriological and molecular studies on toxigenic *Staphylococcus* aureus in milk and some milk products. **BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNA**L, [*s. l.*], v. 31, p. 202-209, dezembro 2016.

ALGAMMAL, A. M. *et al*. Prevalence, Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence and Enterotoxins-Determinant Genes of MRSA Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Egypt. Pathogens, Egito, 9 maio 2020. Disponível em: https://pdfs.semanticscholar.org/5227/265006e1e1f55c78b26a3d60175246432056.pdf. Acesso em: 16 out. 2024.

AL-ZAMILY, Khaleid Yassen *et al*. "Molecular Detection of Some Virulence Genes in *Staphylococcus* aureus Isolated from Different Human Clinical Specimens." Medico-legal update, Iraque, v. 20, n. 2, p. 740-746, 24 ago. 2020. DOI 10.13140/RG.2.2.24927.07843. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343949748_Molecular_Detection_of_Some_Virulence_Genes_in_Staphylococcus_aureus_Isolated_from_Different_Human_Clinical_Specimens. Acesso em: 26 mar. 2024.

AMANZHOLOVA, M. *et al*. “Genetic identification of *Staphylococcus aureus* isolates from cultured milk samples of bovine mastitis using isothermal amplification with CRISPR/Cas12a-based molecular assay.” **Veterinary research communications** vol. 48,1 (2024): 291-300. doi:10.1007/s11259-023-10212-z.

AMARAL, L. A. *et al*., "Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 620–623, out. 2003.

BALABAN, N, and RASOOLY, A. “Staphylococcal enterotoxins.” **International journal of food microbiology** vol. 61,1 (2000): 1-10. doi:10.1016/s0168-1605(00)00377-9.

CHEUNG, G. Y C *et al.* “Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*.” *Virulence* vol. 12,1 (2021): 547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688.

COELHO, P. "Segurança é essencial para evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos." Porto Alegre: Lissandra Mendonça, 7 jun. 2022. Disponível em: https://prefeitura.poa.br/sms/noticias/seguranca-e-essencial-para-evitar-surtos-de-doencas-transmitidas-por-alimentos. Acesso em: 24 fev. 2024.

COELHO, S. M. O. *et al*. "Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene mecA em *Staphylococcus aureus e Staphylococcus intermedius oxacilina-resistentes* isolados de espécies humanas e animais." **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 195–200, jan. 2007.

DIAS, N. L. *et al*., "Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1547–1552, dez. 2011.

EFFENDI, M. H. *et al*. “Detection of coagulase gene in *Staphylococcus aureus* from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction.” **Veterinary world** vol. 12,1 (2019): 68-71. doi:10.14202/vetworld.2019.68-71.

EID, H. M. *et al*. Multidrug-resistant and enterotoxigenic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk of cows at small-scale production units. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 9, n. 1, p. 113-121, 2022.

FAVILLA, A. L. C.; "Detecção de genes que codificam toxinas, leucocidina de panton-valentine e resistência a antibióticos em *staphylococcus aureus e estafilococos* coagulase negativa isolados de queijo minas frescal." Orientador: victor Augustus Marin. 2017. 116 p. Dissertação (Pós-Graduacão em Vigilancia sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/39046/Dissertação_Ana_Luiza_Favilla.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 11 mar. 2024.

FISHOVITZ, J. *et al*. “Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.” IUBMB life vol. 66,8 (2014): 572-7. doi:10.1002/iub.1289

FONSÊCA, A. L.S. *et al*., (2022). Genética e polimorfismo: uma abordagem sobre minissatélites e microssatélites e sua contribuição. **RECISATEC - REVISTA CIENTÍFICA SAÚDE E TECNOLOGIA** - ISSN 2763-8405, 2(5), e25136. https://doi.org/10.53612/recisatec.v2i5.136

GHARIB, A. A. *et al.,* Detection of the *Coa* Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Microbiological Research**, 2013. 4 (1): 37-42.

GHARIB, A. A. *et al.,* Detection of the *Coa* gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 1, p. 37-42, 2013.

GETAHUN, Y. A. *et al.* Coagulase-negative staphylococci from bovine milk: Antibiogram profiles and virulent gene detection. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 263, 2024.

GODINHO, F. M. S. *et al*., XI simpósio brasileiro de microbiologia aplicada, 2018, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. "Detecção de Genes de Enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* Isolados de Leite Cru de Búfala" [...]. [*S. l.*: *s. n.*], 2018. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/10/1121717/v-20-n-4-dez-2018-pag-8-ses-rs_8.pdf. Acesso em: 3 set. 2024.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO (Brasil). Coordenação de assistência técnica integral. Sanidade Animal: Mastite bovina. São Paulo, s.d., Disponível em: https://www.cati.sp.gov.br/portal/produtos-e servicos/publicacoes/acervotecnico/mastitebovina#:~:text=Mastite%20endógena%20causada%20por%20aentes,o%20processo%20infeccioso%20da%20mastite. Acesso em: 8 mar. 2024.

GRISPOLDI, L. *et al. Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. **Italian Journal of Animal Science,** v. 20, p. 677–690, 2021.

HUANG, Z. *et al*. Aptasensors for *Staphylococcus aureus* risk assessment in food.

Frontiers in Microbiology, v. 12, n. 7, p. 14265, 2021.

JAVID, F. *et al*. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. **Veterinary World**, v. 11, p. 423-430, 2018.

JONES, S. **Gram satin of *Staphylococcus aureus***. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/figure/article22388.image.f1/?report=objectonly. Acesso em: 21 fev. 2024.

KEIM, K. C. *et al Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 1300–1301, 2023.

KEYVAN, E *et al*. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk. **Food Science and Technology**, 2020.

KHAIRULLAH, R. A. *et al*. Detection of *mec*A gene and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and risk factors from farms in Probolinggo, Indonesia. **F1000Research,** v. 11, 2022.

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

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco.** 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MASIHINEJAD, A. *et al*. Detection of genes encoding enterotoxins (SEA-D) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from workers' nasal samples and creamy pastries of Shiraz confectioneries. **Iranian Journal of Microbiology,** p. 251-257, 2023.

MILKPOINT. ***Staphylococcus aureus* em produtos lácteos**: **a ameaça invisível**

que você precisa conhecer. 22 ago. 2023. Disponível em: https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/staphylococcus-aureus-em-produtos-lacteos-a-ameaca-invisivel-que-voce-precisa-conhecer-234742/. Acesso em: 24 fev. 2024.

MONTEIRO-JULIAN, F. **Prevenção e controle de uma infecção por *Staphylococcus aureus*: microrganismos de importância farmacêutica.** 2020. Disponível em: https://www.biomerieux-industry.com/pt/pharma-healthcare/resources/pharma-microorganisms-library/2020-03-02-prevention-and control. Acesso em: 9 fev. 2024.

MORALES-UBALDO, A. L. *et al*. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. **Veterinary and Animal Science,** v. 21, p. 100306, 2023.

NAZARI, R *et al*. Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. **Iranian Journal of Veterinary Research,** v. 15, n. 4 p. 409-412, 2014.

NIKOLIC P., MUDGIL P. The cell wall, cell membrane and virulence factors of *Staphylococcus aureus* and their role in antibiotic resistance. **Microorganisms,** v. 11, n. 2, 2023.

ÓRGÃO DE POLÍCIA CRIMINAL (Brasil). ASAE. **Autoridade de segurança alimentar e econômica**: ***Staphylococcus aureus***. 2020. Disponível em: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcusaureus.aspx#:~:text=Características%20gerais, S.,agente%20responsável%20pela%20intoxicação%20alimentar. Acesso em: 14 fev. 2024.

OLIVEIRA, L. A. *et al*. ***Staphylococcus aureus* em lácteos: uma revisão**. In: Anais do XIII Simpósio e VI Semana Acadêmica de Nutrição da UFGD 2022. Anais. Dourados (MS) UFGD, 2022.

OLIVEIRA, S. P. P. *et al.* Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do

Serro fabricados com pingo e com rala. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, 19 fev. 2019.

OOSTHUIZEN, J. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. United States: CDC, 2019. Disponível em: https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=19059. Acesso em: 21 fev. 2024.

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

PINTO, J. B. **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. 124 p. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

PULINGAM, T. *et al*. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170 p. 106103, 2022.

RASHID, N. *et al*. Enterotoxigenic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* contamination in salted fish from Gwadar Balochistan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e247701, 2023.38

REN, Q. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of Dairy Science,** v. 103, 3368-3380, 2020.

SAGIORATO, E.; PFÜLLER, E. E. Análise do processamento do leite para produção de queijo colonial na agroindústria de laticínios Sagiorato Sananduva/RS. **Ramvi, Getúlio Vargas**, v. 2, n. 4, 2015.

SINGH, V.; UJJAL J. P. Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-

system regulates virulence and pathogenicity. **Medical Microbiology and Immunology**, p. 585-607, 2019.

SIPAHI, N. *et al*. The Characterization and beta-lactam resistance of staphylococcal community recovered from raw bovine milk. **Antibiotics**, v. 12, 2023.

STEADMON, M. *et al*. Effects of water turbidity on the survival of *Staphylococcus aureus* in environmental fresh and brackish waters. **Water Environment Research**, p. e10923, 2023.

TITOUCHE, Y. *et al*. Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the dairy production chain. **Journal of Food Science,** p. 3699-3723, 2022.

TURCO, R. O. L. **Quantificação e identificação genotípica do gene *coa* de *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos.** 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em tecnologia de alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/12437/2/LD_COALM_2013_1_01.pdf. Acesso em: 18 fev. 2024.

WANG, W. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology,** v. 9, p. 1-16, 2018.39

VIEIRA, T. B. *et al*. Microbiological and molecular aspects of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in West-Central Brazil. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, 2021.

ZAATOUT, N *et al*. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. **Journal of Applied Microbiology,** p. 1102-1119, 2020.