

Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo *in vitro* de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais

Evaluation of toxicity genes, antimicrobial susceptibility, and *in vitro* antagonism of *Staphylococcus* spp. isolated from artisanal cheese

Dalila Lapinha Silva Oliveira
Rosa^{*}

Leonardo Borges Acúrcio¹

Felipe Machado de Sant'Anna¹

Renata Dias de Castro¹

Bruno Oliver Rosa¹

Sávio Henrique de Cicco Sandes¹

Andreia Marçal da Silva¹

Marcelo Resende de Souza¹

Mônica Maria Oliveira Pinho
Cerqueira¹

RESUMO

Cepas de *Staphylococcus* spp. molecularmente identificadas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores específicos para a detecção de genes codificadores de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) e da Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Foi realizada PCR-Multiplex para detecção dos genes *sea*, *sec*, *sed* e *see*. Para *seb* e *tst*, foram realizadas PCR-Uniplex. Além disso, foi analisado o perfil de susceptibilidade das cepas a antimicrobianos de diferentes classes e foi verificado antagonismo *in vitro* entre *Lactobacillus* spp. e as cepas estudadas. Genes codificadores de enterotoxinas clássicas, assim como de TSST-1, não foram encontrados. Em relação ao antibiograma, Sulfonamida, Penicilina, Ceftazidima e Oxacilina apresentaram os maiores percentuais de resistência (100, 80, 60 e 40%, respectivamente). Os demais antimicrobianos foram eficientes em percentuais acima de 70%. *Lactobacillus* spp. foram capazes de inibir o desenvolvimento *in vitro* de *Staphylococcus* spp. Conclui-se que as cepas estudadas não possuem genes codificadores da produção de enterotoxinas clássicas e TSST-1, são sensíveis à maioria dos antimicrobianos e são inibidos por bactérias do gênero *Lactobacillus*.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus*, Queijo artesanal, PCR, Antibiograma, Antagonismo

ABSTRACT

Staphylococcus spp. isolated from samples of Minas cheese traditionally manufactured following artisan procedures were identified using molecular techniques and further analyzed using PCR and specific primers for the detection of classic enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, and SEE) and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). Specific *sea*, *sec*, *sed*, and *see* genes were identified using multiplex PCR, whereas *seb* and *tst* genes were detected by uniplex PCR. *In vitro* antagonism with *Lactobacillus* spp. was evaluated to assess antimicrobial susceptibility. Classic enterotoxins and TSST-1 genes were not detected. The antimicrobials sulfonamide, penicillin, ceftazidime, and oxacillin showed higher resistance rates in the antibiogram (100%, 80%, 60%, and 40%, respectively), whereas other antimicrobials were effective in percentages above 70%. *Lactobacillus* spp. were able to inhibit *Staphylococcus* spp. *in vitro*. Thus, our results indicated that the isolated *Staphylococcus* spp. were sensitive to the most common antimicrobials tested and were inhibited by *Lactobacillus* spp.

KEYWORDS: *Staphylococcus*, artisanal cheese, PCR, Antibiogram, Antagonism

¹ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

¹¹ Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, Brasil

* E-mail: dalilalapinha@yahoo.com.br

Recebido: 12 mar 2014

Aprovado: 12 ago 2014



INTRODUÇÃO

Staphylococcus spp. estão entre os micro-organismos potencialmente patogênicos mais encontrados em queijos artesanais. Esses micro-organismos são responsáveis pela produção de enterotoxinas termorresistentes em alimentos, tornando estes uma importante fonte de intoxicação alimentar.

As enterotoxinas estafilocócicas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão¹, e são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos², não sendo inativadas totalmente pela cocção, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais³.

Além das enterotoxinas, *Staphylococcus* spp. também são apontados como produtores da Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), que é a principal causa da Síndrome do Choque Tóxico. Essa síndrome é caracterizada por um quadro agudo e potencialmente fatal que se apresenta por meio de febre alta, eritemas difusos e descamação da pele, além de hipotensão e alterações em diversos órgãos. Inicialmente, a Síndrome do Choque Tóxico foi associada à utilização de absorventes internos por mulheres em período menstrual com a colonização da mucosa vaginal por *S. aureus*. A ausência de bacteremia nessas pacientes sugeriu que a doença seria resultado de uma intoxicação por produtos elaborados pelo micro-organismo. Mais recentemente, a síndrome foi associada a diversas enfermidades, como infecções cutâneas, abortos, infecções pós-cirúrgicas e uso de materiais contaminados em curativos, podendo acometer igualmente mulheres e homens⁴. TSST-1 ganhou notoriedade por ser detectada com frequência nos casos de mastite bovina no rebanho leiteiro⁵.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente aplicada como um método para a detecção dos genes responsáveis pela produção de toxinas. Uma variação da PCR, a PCR-Multiplex, permite em uma mesma reação, detectar diferentes genes responsáveis pela codificação da produção de diferentes toxinas, o que contribui de uma forma mais precisa para o estudo epidemiológico de *Staphylococcus* spp. e seu potencial para envolvimento em intoxicações alimentares⁶.

A detecção de genes toxigênicos pode indicar a real possibilidade de determinada cepa produzir a toxina, mesmo que essa característica não esteja sendo expressa e, conseqüentemente, a toxina não esteja sendo produzida⁷.

Outra preocupação em relação aos *Staphylococcus* spp. veiculados pelos alimentos seria a resistência destes a antimicrobianos. A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública que é afetado pelo uso indiscriminado dessas substâncias em humanos e em animais, tendo como consequência seu desenvolvimento e propagação para outros micro-organismos⁸. A referida resistência pode ser adquirida por meio de mutações ou pela transferência de material genético, como ocorre na transferência de plasmídeos entre bactérias, o que pode conferir a resistência por diferentes mecanismos⁹. Micro-organismos resistentes a antimicrobianos veiculados por alimentos podem transferir genes de resistência a outros micro-organismos de outras espécies

presentes no trato gastrointestinal, inclusive para bactérias potencialmente patogênicas presentes na microbiota¹⁰.

Um mecanismo intrínseco de controle de desenvolvimento de patógenos seria a presença de bactérias ácido-láticas, que constituem importante exemplo de micro-organismos desejáveis presentes nesses queijos. Essas bactérias seriam capazes de desempenhar importantes funções, como a produção de ácidos orgânicos e de outros compostos químicos responsáveis pelo sabor característico do produto, além de substâncias antagonistas aos micro-organismos indesejáveis, entre elas as bacteriocinas, substâncias de origem protéica que podem apresentar diferentes atividades bactericidas e/ou bacteriostáticas, agindo contra a microbiota indesejável^{11,12}. *Lactobacillus* apresenta-se como um importante gênero pertencente ao grupo das bactérias ácido-láticas. Diversas pesquisas desenvolvidas visando à ampliação do conhecimento microbiológico e das potencialidades benéficas das bactérias ácido-láticas indicam novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando a sua microbiota desejável¹³.

O objetivo do trabalho foi avaliar cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo artesanal quanto à existência de genes que codificam a produção de toxinas, à susceptibilidade a antimicrobianos e ao crescimento na presença de cepas antagonistas de *Lactobacillus* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas quinze cepas de *Staphylococcus* spp. previamente isoladas de queijo produzido a partir de leite cru provenientes da região da Serra da Canastra (MG). As análises de antibiograma e antagonismo foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Leite e Derivados da Escola de Veterinária da UFMG e as análises envolvendo biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A extração do DNA total dos micro-organismos isolados foi realizada a partir do cultivo recente em caldo *Brain Heart Infusian* - BHI - (Difco, Lawrence, KS, EUA), incubado sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas. De cada cultivo dos micro-organismos que cresceram em caldo BHI, foram obtidos os protoplastos após ação do cloreto de lítio e da lisozima. O DNA total dos protoplastos obtidos de cada cepa foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante. Com o objetivo de visualizar a banda correspondente ao DNA extraído na etapa anterior, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1%), corado por brometo de etídeo (1%), utilizando-se 100 V, durante 60 minutos. Ao término da corrida, o gel foi fotografado, utilizando-se equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta (MultiDoc-IT Digital Imaging System-UVP).



A identificação dos micro-organismos foi realizada por meio de técnicas moleculares baseadas na amplificação de um fragmento do rDNA 16S¹⁴ e os produtos da PCR purificados foram sequenciados em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v.3.1, realizado pela Valid Biotecnologia do Laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária - UFMG. As sequências foram lidas com auxílio do programa Codon Code Aligner (CodonCode Co, Massachusetts, EUA) e do algoritmo BLAST¹⁵.

Para detecção dos genes toxigênicos, a metodologia utilizada foi adaptada¹⁶. Os iniciadores para as reações da PCR foram sintetizados conforme apresentado na Tabela⁶.

Para a pesquisa dos genes *sea*, *sec*, *sed* e *see*, foi realizada uma reação de PCR-Multiplex. Esta foi preparada para um volume final de 25 µL contendo 20 pmol de cada iniciador, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl, 160 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 20 ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96 - Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos) utilizando-se a seguinte programação: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão), e, finalmente, 72°C por 7 minutos para extensão final. Para a pesquisa dos genes *seb* e *tst*, foram realizadas duas reações de PCR-Uniplex. Essas reações foram realizadas para um volume final também de 25 µL contendo os mesmos componentes e nas mesmas proporções que o descrito anteriormente. A amplificação do fragmento para o gene *seb* foi programada para 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e, finalmente, 72°C por 2 minutos. A reação do fragmento para o gene *tst* foi programada para 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e, finalmente,

72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação das reações de PCR- Multiplex e PCR-Uniplex foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,0%), corado com brometo de etideo (1,5%) por 60 minutos, visualizados e fotografados em equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta. Como controle positivo, foram utilizadas as cepas padrão de *Staphylococcus* spp. FRI MN8, para os genes *sea* e *tst*; FRI S6, para o gene *seb*; FRI 361, para os genes *sec* e *sed* e FRI 326, para o gene *see*, provenientes de Food Research Institute (FRI-USA).

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade antimicrobiana, pelo princípio de difusão da droga, utilizando-se discos e medindo-se o diâmetro dos halos de inibição¹⁷ e oficializado por *Clinical Laboratory and Standards Institute*¹⁸. Após ativação em caldo BHI, as quinze cepas de *Staphylococcus* spp. foram cultivadas em ágar BHI, sendo, posteriormente, transferidas a tubos contendo 3,5 mL de salina 0,85% para obter-se concentração correspondente a 0,5 na escala Mc Farland (10⁸ UFC/mL). Em seguida, foram feitos inóculos utilizando-se zaragatoas estéreis sobre a superfície de placas tipo pizza (14 cm de diâmetro) contendo o mesmo ágar. Logo após, foram distribuídos os discos (*Laborclin, Paraná, Brasil*) contendo os antimicrobianos. As placas foram incubadas em aerobiose, durante 24 horas a 35°C. Foram utilizadas as seguintes drogas: Ciprofloxacina 5 µg, Penicilina G 10 U, Cloranfenicol 30 µg, Vancomicina 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Gentamicina 10 µg, Estreptomina 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Oxacilina 1 µg, Clindamicina 2 µg, Eritromicina 5 µg, Ampicilina 10 µg, Sulfazotrim 25 µg, Imipenema 10 µg, Cefoxitina 30 µg, Amicacina 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, Cefaclor 30 µg, Amoxicilina 10 µg, Nitrofurantoina 300 µg e Sulfonamida 300 µg.

Após a incubação, com auxílio do paquímetro digital (*Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brasil*), foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como micro-organismo controle no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Tabela. Iniciadores usados para a detecção por PCR dos genes *sea-see* e *tst* em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (Minas Gerais, Brasil).

Gene	Iniciadores	Sequência de oligonucleotídeos (5'>3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>sea</i>	SEA Fw	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA Rv	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
<i>seb</i>	SEB Fw	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB Rv	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
<i>sec</i>	SEC Fw	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC Rv	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
<i>sed</i>	SED Fw	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED Rv	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
<i>see</i>	SEE Fw	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE Rv	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
<i>tst</i>	TST Fw	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST Rv	ATCGAACTTTGGCCCATCTTT	



Os resultados expressos de forma quantitativa foram utilizados para uma classificação qualitativa dos micro-organismos como sendo: sensíveis, intermediários ou resistentes às drogas antimicrobianas testadas¹⁸. O antibiograma foi realizado em duplicata em duas repetições.

Os testes de antagonismo foram realizados para avaliar o crescimento das cepas de *Staphylococcus* spp. na presença de três cepas de *Lactobacillus* spp. diferentes, sendo uma cepa de *L. plantarum* e duas cepas de *L. rhamnosus*. As cepas de *Lactobacillus* spp. foram isoladas da mesma origem das cepas de *Staphylococcus* spp. do presente estudo. De acordo com a metodologia do antagonismo¹⁹, *Lactobacillus* spp. foram previamente cultivados em caldo *Man, Rogosa and Sharpe* - MRS - (Difco, Lawrence, KS, EUA), a 37°C por 24 horas, sob aerobiose. Após duas ativações, cinco mL de cada cultivo de micro-organismo foram colocados sobre o centro da superfície de uma placa de Petri contendo ágar MRS, que foi incubada sob aerobiose a 37°C durante 48 horas. Após esse período, as placas foram retiradas das câmaras de incubação com as manchas no centro das placas devidamente crescidas. Foi colocado clorofórmio nas tampas dessas placas, deixando-o agir por 30 minutos sob luz ultravioleta (luz UV). Com isso, os micro-organismos que cresceram nas manchas foram eliminados e foi possibilitada a avaliação da ação de supostas substâncias inibidoras produzidas pelas bactérias e liberadas no meio de cultura. Em seguida, 3,5 mL de ágar BHI semi-sólido foram inoculados com 100 µL de cada cepa de *Staphylococcus* spp. e foram vertidos sobre as placas de ágar MRS, após os 30 minutos de ação do clorofórmio e da luz UV. As placas foram então incubadas a 37°C durante 48 horas, sob aerobiose. Posteriormente, a leitura dos halos de inibição foi realizada com o paquímetro digital. Esse teste foi realizado em triplicata (a mesma cepa de *Lactobacillus* spp. foi aplicada em três placas com a mesma cepa de *Staphylococcus* spp. testada) em três repetições. Os resultados foram submetidos às análises estatísticas descritivas e não paramétricas, sendo que a comparação entre as médias dos diferentes tratamentos realizados foi feita de acordo como teste de Kruskal-Wallis²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quinze cepas de *Staphylococcus* spp. foram identificadas como sendo dez *S. aureus* subsp. *aureus*, três *S. saprophyticus* subsp. *bovis* e duas *S. warneri*. Não foram encontrados genes codificadores de toxinas estafilocócicas em nenhuma das cepas analisadas, havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* nas cepas de referência (FRI) utilizadas como controle positivo. Resultados semelhantes²¹ foram encontrados ao analisar 23 isolados de *Staphylococcus* spp. envolvidos em casos de intoxicação alimentar, pois não foi observada a produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas foi detectada a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estes podem ser os responsáveis pela produção das toxinas envolvidas nos surtos de intoxicação alimentar. Similarmente, outro trabalho²² mostrou que nenhum dos 94 isolados de *S. aureus* provenientes de leite e queijo de coalho examinados pela PCR-Multiplex comportava os

genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst*. Em contrapartida, nesse mesmo trabalho, foi detectado em 93,6% das cepas pelo menos um dos genes que codificam as enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ. O referido autor atribuiu a ausência de genes para as toxinas clássicas e a presença dos genes para as demais toxinas descritas ao tempo e à distribuição geográfica dos isolados toxigênicos. Segundo ele, os perfis dos genes para as enterotoxinas estafilocócicas parecem ser variáveis entre diferentes anos e origens geográficas. Em outro trabalho⁶ semelhante, 20 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho foram analisadas e não foram encontrados genes toxigênicos para as enterotoxinas SEA, SEB e SEE, porém, em 90% das cepas, foi observado pelo menos um dos genes *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *tst*, nas respectivas proporções: 11%, 9%, 20%, 16%, 25%, 14% e 5%.

A presença dos genes toxigênicos *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em 95 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos provenientes de três fazendas diferentes da região da Serra da Canastra (Minas Gerais, Brasil) foi analisada²³, em diferentes períodos de maturação, e não foi encontrado resultado positivo em nenhuma delas. A maturação é uma das formas de melhorar a qualidade microbiológica do queijo, mesmo havendo contagem inicial de patógenos elevada, esse processo favoreceria a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos considerados de fundamental importância para a estabilidade e a segurança alimentar do queijo²⁴. A diminuição da contagem bacteriana ao longo da maturação pode estar relacionada com a produção de ácidos orgânicos, assim como a perda de água e aumento da concentração de sólidos totais, como o cloreto de sódio, o que inibe o crescimento microbiano²⁵.

Baixa frequência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênico foi encontrada²⁶ em leite de vacas com mastite: das 64 cepas isoladas, somente quatro apresentaram os genes *sea* e *seb* e apenas duas tinham o gene *sec*. Resultados semelhantes foram encontrados no Japão²⁷, onde foram analisadas 21 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite não sendo detectado nenhum gene que codifica para enterotoxina estafilocócica clássica.

Analisando-se os resultados apresentados no presente trabalho e nos demais apresentados pela literatura, percebe-se que a detecção de genes toxigênicos em cepas de *Staphylococcus* spp. pode se apresentar bastante variável, principalmente quando se trata das enterotoxinas clássicas.

Em relação ao antibiograma, de modo geral, as quinze cepas apresentaram baixo percentual de resistência aos 20 antimicrobianos testados. As cepas testadas apresentaram maior percentual de resistência para Sulfonamida (100%). Alto percentual de resistência também foi observado para Penicilina (80%), Cefotaxima (60%) e Oxacilina (40%). Entretanto, para os demais antimicrobianos testados, foi observado percentual de resistência inferior a 30%. Ciprofloxacina, Tetraciclina, Ampicilina e Amoxicilina revelaram somente 26,7% de cepas resistentes; Cloranfenicol, Sulfazotrim e Nitrofurantoina foram ineficazes em meros 13,3% das cepas; as demais drogas (Vancomicina, Gentamicina, Clindamicina, Eritromicina, Imipenem,



Cefoxitina, Amicacina, Ceftriaxona e Cefaclor) mostraram-se eficientes em 100% das cepas testadas.

O resultado do presente trabalho é semelhante aos encontrados na literatura em que cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram percentual de resistência à Penicilina superior a 50%^{8,28,29,30}.

Atualmente, a oxacilina e a cefoxitina têm sido utilizadas para avaliar a resistência à meticilina¹⁸. Os resultados encontrados para essas drogas foram bastante divergentes, sendo que 40% das cepas testadas apresentaram resistência para a primeira e todas as cepas foram sensíveis à segunda. Apesar dos resultados obtidos por meio do teste de difusão de discos contendo antimicrobianos, a detecção do gene *mecA*, que codifica a resistência à meticilina por meio de técnicas moleculares como a PCR, é considerada como padrão ouro para identificar esse tipo de micro-organismo³¹. Portanto, os resultados fenotípicos podem não estar de acordo com o genótipo do micro-organismo.

Quanto ao antagonismo *in vitro*, as cepas de *Lactobacillus* spp. foram capazes de inibir todas as cepas de *Staphylococcus* spp. testadas. Tendo em vista que ambas foram isoladas dos mesmos queijos, sugere-se que essa mesma inibição poderia ocorrer também nesse produto, o que explicaria a baixa ocorrência de surtos relacionados ao consumo de queijos artesanais. Não houve diferença ($p < 0,05$) entre as atividades antagonistas das bactérias ácido-láticas, o que indica que, dentro de um mesmo gênero de bactéria ácido-lática, a capacidade de inibição

pode ser semelhante. Resultado semelhante³² foi encontrado ao analisarem a atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. frente a diversos micro-organismos patogênicos, entre eles *Staphylococcus* spp., no qual foi observada atividade antagonista das bactérias ácido-láticas em todas as cepas patogênicas testadas. Além disso, *Lactobacillus rhamnosus* foi o que apresentou a maior média de halos de inibição frente a *Staphylococcus* spp. Outros trabalhos da literatura^{33,34} também demonstraram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo artesanal frente a *S. aureus* e a outros micro-organismos patogênicos. Simulando o antagonismo em condições reais de produção¹³, a viabilidade de *S. aureus* produtor de SEB foi avaliada em queijos experimentais elaborados com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* e foi observado que, apesar desses micro-organismos não terem sido capazes de impedir o crescimento de *S. aureus*, houve uma potencial inibição da produção da enterotoxina estafilocócica, o que aponta a contribuição desses micro-organismos ácido-láticos na melhoria da qualidade sanitária de queijos artesanais.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que as cepas de *Staphylococcus* spp. estudadas não são capazes de provocar intoxicação alimentar por enterotoxinas clássicas, possuem sensibilidade aos principais antimicrobianos e possuem seu desenvolvimento inibido na presença de bactérias ácido-láticas.

REFERÊNCIAS

1. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003;2(1):63-76.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiologia médica. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
3. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 7a ed. New York: Springer; 2005.
4. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):16-34. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000>
5. Nader Filho A, Ferreira LM, Amaral LA, Rossi Junior OD, Oliveira RP. Produção de enterotoxinas e da toxinas da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. Arq Bras Med. Vet Zootec. 2007;59(5):1316-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>
6. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol 1998;36(9):2548-553.
7. Shimitz F-J, Steiert M, Hofmann B, Verhoef J, Hadding U, Heinz H-P et al. Development of multiplex-PCR for direct detection of the genes enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus* isolates. J Med Microbiol 1998;47(4):335-40.
8. Costa JCB. Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2010. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4013>
9. Ratti RP, Sousa CP. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2009;30(2):137-43.
10. Witte W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. Int J Antimicrobiol Agents. 2000;14(4):321-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00144-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00144-8)
11. Ross RP, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. Int J Food Microbiol. 2002;79(1-2):3-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
12. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology and application. Annu Rev Microbiol. 2002;56:117-37. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
13. Costa HHS, Souza MR, Acúrcio LB, Cunha AF, Resende MFS, Nunes AC. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013;65(6):1858-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000600038>



14. Lange CC, Brito MAVP, Brito JRF, Arcuri EF, Souza GN, Machado MA, et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. *Pesq Vet Bras.* 2011;31(1):36-40. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100006>
15. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7(1/2):203-14. <http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>
16. Freitas MFL, Luz IS, Pinheiro Júnior JW, Duarte DAM, Vasconcelos AMM, Ribeiro AR, et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2009; 29(2):375-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200022>
17. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
18. Clinical and Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards; 2012 (CLSI document M100-S21).
19. Tagg JR, Dajami AS, Wannamaker LW. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976;40(3):722-56.
20. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 2002.
21. McLaughlin J, Narayanan GL, Mithani V, O'neill G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2000;63(4):479-88.
22. Luz IS. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco [dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
23. Borelli BM, Lacerda ICA, Brandão LR, Vianna CR, Ferreira MC, Gomes FCO et al. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2011;63(2):481-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>
24. Marcos A. Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. In: Fox PF, editor. *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* 2nd ed. London: Chapman & Hall; 1993. Vol 1; General aspects, p. 439-69.
25. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J.* 2001;11(4-7):259-74. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
26. Silva ER, Carmo LS, Silva N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet Microbiol.* 2005;106(1-2):103-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.005>
27. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D-L, Ueda S, Shinagawa K. Detection of seg, she, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):857-62. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.3.857-862.2002>
28. Rapini LS, Teixeira JP, Martins NE, Cerqueira MMOP, Souza MR, Penna CFAM. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56(1):130-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000100022>
29. André MCDPB, Campos MRH, Borges LJ, Kipnis A, Pimenta FC, Serafini AB. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control.* 2008;19(2):200-7.
30. Resch M, Nagel V, Hertel C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int J Food Microbiol.* 2008;127(1-2):99-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.013>
31. Miyazaki NHT. Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.
32. Guedes Neto LG, Souza MR, Nunes AC, Nicoli JR, Santos WLM. Atividade antagonista de bactérias isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57(2):245-50. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000800017>
33. Alexandre DP, Silva MR, Souza MR, Santos WLM. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro-organismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54(4):424-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352002000400014>
34. Vaughan EE, Caplice E, Looney R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J Appl Bacteriol.* 1994;76(2):118-23.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo financiamento do projeto.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.