

**KALLYANE LIRA DE ARAÚJO**

**PESQUISA DOS GENES *blaZ* E *mecA* EM *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJOS MUSSARELA E FATIADORES  
DE FRIOS**

**GARANHUNS-PE**

**2019**

**KALLYANE LIRA DE ARAÚJO**

**PESQUISA DOS GENES *blaZ* E *mecA* EM *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJOS MUSSARELA E FATIADORES  
DE FRIOS**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Medicina Veterinária da Unidade  
Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos  
exigidos para obtenção do título de Bacharel em  
Medicina Veterinária.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça**

**GARANHUNS- PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A663p Araújo, Kallyane Lira de  
Pesquisa dos genes blaZ e mecA em Staphylococcus coagulase negativa isolados de queijos mussarela e fatiadores de frios / Kallyane Lira de Araújo. - 2019.  
43 f. : il.

Orientador: Marcelo Mendonça Mendonça.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Garanhuns, 2019.

1. ?-lactamase. 2. saúde pública. 3. estafilococos. 4. resistência antimicrobiana. I. Mendonça, Marcelo Mendonça, orient. II. Título

CDD 636.089

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DOS GENES *blaZ* E *mecA* EM *Staphylococcus* COAGULASE  
NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJOS MUSSARELA E FATIADORES  
DE FRIOS**

Trabalho de conclusão de curso elaborado por:

**KALLYANE LIRA DE ARAÚJO**

Aprovado em:    /    /

**BANCA EXAMINADORA**

---

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça  
Unidade Acadêmica de Garanhuns- UFRPE

---

Prof. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva  
Unidade Acadêmica de Garanhuns- UFRPE

---

Ana Erundina de Luna Moraes Leite  
Médica Veterinária- Indústria de Laticínios LETA

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE PERNAMBUCO**

**FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO**

**I. ESTAGIÁRIO**

NOME: Kallyane Lira de Araújo

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2019.2

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Ana Maria Camelo de Moura

FORMAÇÃO: Bióloga

**II. EMPRESA/ INSTITUIÇÃO**

NOME: LAMEN- Laboratório de Alimentos, Água e Ambientais

ENDEREÇO: Rua Dr. José Mariano, Nº 503, Santo Antônio, Garanhuns-PE

CIDADE: Garanhuns

ESTADO: Pernambuco

CEP: 55292- 335

FONE: (87) 3762- 0266

**III. FREQUÊNCIA**

INÍCIO E TÉRMINO DO ETÁGIO: 01/08/2019 a 30/08/2019

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 176 horas

# **FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO**

## **I. ESTAGIÁRIO**

NOME: Kallyane Lira de Araújo

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2019.2

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Ana Erundina de Luna Moraes Leite

FORMAÇÃO: Médica Veterinária

## **II. EMPRESA/ INSTITUIÇÃO**

NOME: Industria de Laticínios LETA Ltda

ENDEREÇO: Avenida Projetada, Nº 20, Parque Industrial

CIDADE: Bom Conselho

ESTADO: Pernambuco

CEP: 55330-000

FONE: (87) 3771-1529

## **III. FREQUÊNCIA**

INÍCIO E TÉRMINO DO ETÁGIO: 02/09/2019 A 24/10/2019

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 234 horas

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar comigo em absolutamente todos os momentos e por ser minha fortaleza nos momentos de fraqueza.

Agradeço ao meu pai, por ter plantado e sempre regado o sonho da veterinária em mim. Sei que esse sonho é mais seu que meu. A minha mãe, minha eterna professora e minha melhor amiga, por todos os ensinamentos e palavras confortantes nesses anos em que a distância foi maior. Ao meu irmão, que nos últimos anos dividiu comigo essa carga e me aguentou nos momentos mais difíceis.

Em especial, ao meu avô, Zé Dentista, que apesar da distância, sempre se manteve por perto. Sei que de onde estiver, está muito feliz por cada passo dado.

Aos meus avós, tios, primos e padrinhos, obrigada por serem sempre a família que são. Apesar da distância, sempre se fizeram presentes, numa simples ligação ou mensagem.

A minha família de Garanhuns, Jardel Alves e Adriana Tenório, que me acolheram e foram verdadeiros pais para mim.

Aos meus amigos de infância, Caio Fernando, Eduarda Germino, Mariana Mendes, Sabrina César, Gislenne Nunes, Samira Medeiros, Pabliny Santos, Isabella Freitas, Rayane Souza, Amanda Carvalho e Alessandra Vasconcelos, desde pequenos estão comigo.

Aos meus futuros colegas de profissão e amigos que fiz durante o curso, a todos que de alguma maneira dividiram comigo esse fardo, deixando os dias mais leves. Em especial a Chalanna Gonçalves, Daniel Baia, Matheus Galindo, Rafaela Santos, Renata Brito, Amanda Lucas, Laerte Roger, Lorena Galdino, Enoana D'arc, Ian Patriota e Yulene Duarte, não consigo nem imaginar essa caminhada sem vocês.

Aos meus filhos de quatro patas Jujuba e Luck, por me motivarem todos os dias a ser uma pessoa melhor, tanto profissionalmente, quanto como ser humano.

Aos professores e técnicos, que foram essenciais para minha formação. E que muitas vezes, foram flores, quando tudo eram espinhos.

Ao meu orientador, Marcelo Mendonça, pela oportunidade de crescimento acadêmico ao longo de todos esses anos, e por sempre ter algo novo a ensinar, por mais simples que seja.

A professora Elizabete Rodrigues, por toda paciência, disponibilidade e por ter cedido o laboratório e todo material necessário para execução deste trabalho.

A Ana Erundina Moraes, que foi um presente em minha vida, e desde a graduação tem sido uma irmã mais velha, e foi uma supervisora maravilhosa durante o estágio. Sempre buscando o melhor pra mim.

A todos que fazem o LAMEN, em especial aos meus amigos João Neto, Karoline Capitó e Anne Carolyne, por todo conhecimento e companheirismo que tiveram comigo durante o estágio.

A todos da LETA, que me receberam super bem e tiveram toda paciência comigo durante esses dois meses, e fizeram com que todos os dias se tornassem mais leves.

A todos que de alguma maneira cruzaram comigo nessa caminhada, meu muito obrigada!



## RESUMO

Os microrganismos *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) são ubíquos na natureza e possuem a capacidade de produzir diversos fatores de virulência, dentre eles, o potencial de expressar genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, e produzir enterotoxinas, envolvidas nas intoxicações alimentares em humanos, além da capacidade de produção de biofilmes, formando um tipo de adesão bacteriana sobre as superfícies. A realização deste trabalho teve como objetivo pesquisar a presença dos genes *blaZ* e *mecA*, em *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijos Mussarela e fatiadores de frios na cidade de Garanhuns- PE. Foram utilizadas 85 amostras bacterianas isoladas de queijo Mussarela e de equipamentos de fatiamento de frios, incluindo nove espécies de SCN e outros isolados agrupados dentro do gênero *Staphylococcus*. Do total de 85 amostras de SNC analisadas, 67,06% (57 isolados) foram positivas para os genes *blaZ* e *mecA*, enquanto que 32,94% (28 isolados) foram negativas para os genes em questão. Quando avaliados isoladamente, 37,65% (32/85 amostras) foram positivas apenas para o gene *blaZ*, 3,52% (3/85 amostras) apresentaram amplificação para o gene *mecA* e 25,89% (22/85 amostras) foram positivas para ambos os genes. Em relação à produção da enzima  $\beta$ -lactamase, das 85 amostras, 52,94% (45/85) foram positivas e 47,06% (40/85) foram negativas quanto a produção desta enzima. Os resultados demonstraram que SCN isolados de queijos Mussarela apresentam potencial para expressar mecanismos de resistência antimicrobiana, podendo impactar negativamente a saúde dos consumidores de derivados lácteos.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lactamase, saúde pública, estafilococos, resistência antimicrobiana.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Sala de inoculação das amostras destinadas as análises microbiológicas.....	15
<b>Figura 2.</b> Sala de incubação das amostras oriundas das análises microbiológicas.....	16
<b>Figura 3.</b> Sala de esterilização de materiais e preparo de meios.....	16
<b>Figura 4.</b> Sala de análise físico-química de amostras de água e alimentos.....	16
<b>Figura 5.</b> Fachada da Indústria de Laticínios LETA Ltda, Bom Conselho-PE.....	18
<b>Figura 6.</b> Sala de resfriamento, pasteurização e desnate do leite.....	19
<b>Figura 7.</b> Área de processamento de bebida láctea fermentada, petit suisse, iogurte e coalhada.....	19
<b>Figura 8.</b> Área de processamento e envase de requeijão e manteiga.....	19
<b>Figura 9.</b> Sala de envase de bebida láctea fermentada.....	20
<b>Figura 10.</b> Laboratório da indústria de laticínios LETA.....	20
<b>Figura 11.</b> Atividade do Plano de Qualificação dos Fornecedores de Leite (PQFL) - LETA....	21
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> por PCR multiplex.....	37
<b>Figura 13.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> por PCR multiplex.....	37
<b>Figura 14.</b> Padrão e alteração de cor dos discos Cefinase para detecção de $\beta$ -Lactamase.....	37
<b>Figura 15.</b> Isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa produtores e não produtores de $\beta$ -lactamase pelo método fenotípico.....	38

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Total de análises microbiológicas desenvolvidas e/ou acompanhadas no LAMEN, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o tipo de amostra.....	17
<b>Tabela 2.</b> Total de análises físico-química desenvolvidas e/ ou acompanhadas no LAMEN, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o tipo de amostra.....	18
<b>Tabela 3.</b> Frequência absoluta e relativa de espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas de amostras de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores.....	32
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado e referência.....	34
<b>Tabela 5.</b> Frequência absoluta e relativa dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> detectados em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isolados de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores em Garanhuns-PE. ....	36
<b>Tabela 6.</b> Frequência absoluta e relativa de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa produtores da enzima $\beta$ -lactamase de acordo com a presença dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> .....	39

## LISTA DE QUADROS

### Página

<b>Quadro 1.</b> Detalhamento das atividades desenvolvidas no LAMEN por setor, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o setor do laboratório.....	17
<b>Quadro 2.</b> Atividades desenvolvidas na Indústria de Laticínios LETA, durante o período de 02/09/2019 a 24/10/2019, de acordo com o setor do laticínio.....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIQ-** Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
- ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BHI-** Caldo Cérebro Coração
- BPF-** Boas Práticas de Fabricação
- CMT-** *California Mastitis Test*
- CENLAG-** Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns
- EPI-** Equipamento de Proteção Individual
- ESO-** Estágio Supervisionado Obrigatório
- LAMEN-** Laboratório de Alimentos, Água e Ambientais
- LAPEMI-** Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunodiagnóstico
- MAPA-** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MRSA-** *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina
- OMS-** Organização Mundial de Saúde
- PCR-** Reação em Cadeia de Polimerase
- PQFL-** Plano de Qualificação dos Fornecedores de Leite
- POA-** Produtos de Origem Animal
- RDC-** Resolução da Diretoria Colegiada
- RTIQ-** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
- SCN-** *Staphylococcus* coagulase negativa
- SCP-** *Staphylococcus* coagulase positiva
- SEs-** Enterotoxinas
- SIF-** Serviço de Inspeção Federal
- UAG-** Unidade Acadêmica de Garanhuns
- UFRPE-** Universidade Federal Rural de Pernambuco

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>CAPÍTULO I- DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO) E ATIVIDADES REALIZADAS</b> .....	<b>15</b>
<b>1.0 LOCAIS DO ESO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 LAMEN- Laboratório de Alimentos, Água e Ambientais</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 Atividades Desenvolvidas</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Indústria de Laticínios LETA</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.1 Atividades Desenvolvidas</b> .....	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Origem dos queijos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Produção de queijos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1 Produção mundial de queijos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.2 Produção de queijos no Brasil</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 Importância do queijo como nutriente</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4 Queijo Mussarela</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 Contaminação por microrganismos nos queijos</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa</b> .....	<b>28</b>
<b>2.8 Resistência antimicrobiana</b> .....	<b>29</b>
<b>2.9 Importância de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa em Saúde Pública</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Amostras bacterianas</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Análises dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.2.1 Extração e purificação do DNA bacteriano</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2.2 Reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR Multiplex)</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.3 Eletroforese e visualização dos produtos amplificados</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3 Teste de reprodutibilidade</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4 Análise estatística</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5 Produção da enzima <math>\beta</math>-lactamase</b> .....	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## **CAPÍTULO I- DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO) E ATIVIDADES REALIZADAS**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), foi realizado durante os meses de agosto a outubro de 2019, tendo seu início no dia 01/08/2019 e sendo finalizado no dia 24/10/2019, totalizando a carga horária de 405 horas. O ESO aconteceu em duas empresas privadas, a primeira parte foi realizada no LAMEN- Laboratório de Alimentos, Água e Ambientais durante o mês de agosto, e a segunda parte ocorreu na Indústria de Laticínios LETA Ltda durante os meses de setembro e outubro.

### **1.0 LOCAIS DO ESO**

#### **1.1 LAMEN- Laboratório de Alimentos, Água e Ambientais**

O LAMEN fica situado na cidade de Garanhuns-PE, Rua Dr. José Mariano, 503 e tem como missão contribuir para a qualidade dos produtos alimentícios consumidos pela população e realizando análises e consultorias, prevenir os riscos de contaminações. O laboratório conta com três técnicos que realizam análises físico-químicas e microbiológicas em alimentos e água.

O laboratório é dividido em quatro salas: Sala de Inoculação (Figura 1), sala de incubação (Figura 2), sala de esterilização e preparo de meios (Figura 3) e sala de análise físico-química (Figura 4), além de possuir áreas para recepção de amostras, lavagem de materiais, banheiro e vestiário. O horário de funcionamento do LAMEN é de segunda a sábado, das 08:00h as 12:00h e de segunda a sexta-feira das 14:00h as 18:00h.



**Figura 1.** Sala de inoculação das amostras destinadas as análises microbiológicas.



**Figura 2.** Sala de incubação das amostras oriundas das análises microbiológicas.



**Figura 3.** Sala de esterilização de materiais e preparo de meios.



**Figura 4.** Sala de análise físico-química de amostras de água e alimentos.



### 1.1.2 Atividades Desenvolvidas

O LAMEN oferece aos estagiários o acompanhamento por todos os setores do laboratório de forma que o discente entenda como funciona toda a empresa, sendo desenvolvidas atividades de registro de amostras, análises microbiológicas e físico-químicas de água e alimentos, coletas de amostras, preparação de meios de cultura, lavagem e esterilização de materiais, limpeza do laboratório, interpretação dos laudos, além das atividades relacionadas a gestão e qualidade da empresa.

**Quadro 1. Detalhamento das atividades desenvolvidas no LAMEN por setor, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o setor do laboratório.**

<b>Setor do Laboratório</b>	<b>Detalhamento da Atividade</b>
Recepção e registro de amostras	Recepção das amostras de acordo com as fichas de coletas, e registro das amostras de acordo com a análise a ser realizada.
Análises microbiológicas	Realização de análises microbiológicas em alimentos e água de acordo com a legislação vigente em cada caso.
Análises físico-químicas	Realização de análises físico-químicas em água e alimentos de acordo com a legislação vigente em cada caso.
Lavagem e esterilização de materiais	Descontaminação, lavagem e esterilização dos materiais utilizados na rotina do laboratório, bem como o descarte dos materiais perfuro-cortantes a empresa responsável.
Preparação de meios de cultura	Acompanhamento do preparo de todos os meios de cultura utilizados nas análises de alimentos e água.
Interpretação de laudos	Acompanhamento da interpretação dos resultados para posterior emissão e envio dos laudos.
Gestão e qualidade	Acompanhamento da atualização dos registros de gestão e qualidade da empresa.

**Tabela 1. Total de análises microbiológicas desenvolvidas e/ou acompanhadas no LAMEN, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o tipo de amostra.**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Total</b>
Água	121
Alimentos	57
Swab	19
<b>Total</b>	<b>197</b>

**Tabela 2. Total de análises físico-química desenvolvidas e/ ou acompanhadas no LAMEN, durante o período de 01/08/2019 a 30/08/2019, de acordo com o tipo de amostra.**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Total</b>
Água	63
Alimentos	6
<b>Total</b>	<b>69</b>

## 1.2 Indústria de Laticínios LETA

A segunda parte do ESO foi na Indústria de Laticínios LETA Ltda, que tem sua sede situada na Avenida Projetada, 20, Parque Industrial, na cidade de Bom Conselho- PE, no período de 02/09/2019 a 24/10/2019, totalizando 234 horas de estágio (Figura 5).

A LETA compõe uma das marcas do grupo Bomtempo, além da Frutigutti e Puro do Leite e conta com mais de 200 colaboradores, presente em quatro estados com mais de 20 tipos de produtos no mercado. A indústria funciona 24 horas todos os dias da semana e produz uma diversidade de iogurtes, bebidas lácteas, queijos, manteiga, coalhadas, requeijão e cobertura cremosa (Figuras 6 a 9).



**Figura 5.** Fachada da Indústria de Laticínios LETA Ltda, Bom Conselho-PE.



**Figura 6.** Sala de resfriamento, pasteurização e desnate do leite.



**Figura 7.** Área de processamento de bebida láctea fermentada, petit suisse, iogurte e coalhada.



**Figura 8.** Área de processamento e envase de requeijão e manteiga.



**Figura 9.** Sala de envase de bebida láctea fermentada.



**Figura 10.** Laboratório da indústria de laticínios LETA.

### 1.2.1 Atividades Desenvolvidas

A maior parte das atividades foram desenvolvidas no âmbito da indústria, principalmente no laboratório (Figura 10), realizando análises de rotina no leite e derivados, acompanhando a produção diária da empresa, visitando diariamente todos os setores da fábrica, analisando os pontos críticos e de controle. Também foram realizadas atividades de acompanhamento dos produtores fornecedores de leite para a indústria, com a realização do teste de California Mastitis Test- CMT e fornecendo orientações aos mesmos, a fim de melhorar a qualidade do leite que chega na empresa (Figura 11). Todas as atividades estão descritas detalhadamente no Quadro 2.



**Figura 11.** Atividade do Plano de Qualificação dos Fornecedores de Leite (PQFL)- LETA.

**Quadro 2.** Atividades desenvolvidas na Indústria de Laticínios LETA , durante o período de 02/09/2019 a 24/10/2019, de acordo com o setor do laticínio.

<b>Setor da Indústria</b>	<b>Detalhamento da Atividade</b>
Laboratório	Realização de análises físico-químicas no leite recebido pela indústria; acompanhamento da matéria prima durante toda linha de produção até o produto acabado.
Área de produção	Garantia da conservação do produto, em todo o processo de fabricação; conscientização sobre o correto uso de Equipamentos de Proteção Individuais.
Limpeza e higienização de equipamentos e instalações	Orientação quanto as condições de higiene das instalações, equipamentos e do pessoal; orientação quanto a aquisição e ao emprego de detergentes e sanitizantes nos processos industriais.
Tratamento de água e efluentes	Certificação da qualidade da água de abastecimento; análise diária da água utilizada no âmbito da indústria.
Almoxarifado	Orientação da aquisição, uso e acondicionamento de matéria-prima, aditivos, conservantes, estabilizantes e embalagens.
Visitas técnicas	Atividade de melhoramento na qualidade da matéria-prima, nas propriedades rurais; garantia da execução dos exames laboratoriais.
Transporte e comercialização	Orientação sobre as boas práticas de transporte e comercialização de produtos; garantia do destino adequado dos produtos condenados e o seguro acondicionamento dos alimentos sequestrados.
Gestão e qualidade	Acompanhamento dos memoriais descritivos, atentando para a comunicação ao órgão oficial; treinamento dos colaboradores da empresa quanto as Boas Práticas de Fabricação; estabelecimento e orientação do controle de qualidade dos produtos elaborados.

## **CAPÍTULO II- PESQUISA CIENTÍFICA- PESQUISA DOS GENES *blaZ* E *mecA* EM *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJOS MUSSARELA E FATIADORES DE FRIOS**

### **1. INTRODUÇÃO**

O queijo é definido como sendo o produto fresco ou maturado que se obtém através da separação do soro do leite, de leite reconstituído ou de soros lácteos, coagulados pela ação física de enzimas ou bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou em combinação para uso alimentar, e todas essas características resultarão na qualidade e no valor comercial de cada tipo de queijo (BRASIL, 1996).

O queijo Mussarela teve origem na Itália, e inicialmente era produzido a partir do leite de búfala, porém dada a sua grande aplicação como ingrediente em pizzas, massas e alimentos prontos para o consumo, atualmente o queijo Mussarela é obtido também através do leite bovino (JANA e MANDAL, 2011). Segundo dados da ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijos, o queijo Mussarela é o mais produzido e consumido no Brasil, e sua produção compreende diferentes tecnologias, por isso é encontrado em diversas variações de venda (ABIQ, 2018). É classificado como um queijo semi gordo, gordo ou extra gordo, obtido através da filtragem de uma massa acidificada, de cor esbranquiçada, firme e filante (BRASIL, 1996). E por ser considerado um alimento altamente nutritivo, torna-se uma ótima alternativa para proliferação de uma variedade de bactérias patogênicas, sendo o gênero *Staphylococcus* um dos principais microrganismos (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018).

*Staphylococcus* spp. são microrganismos mesófilos, com tamanho médio de 2 mm de diâmetro, em formatos de cocos, Gram-positivas, anaeróbios facultativos, imóveis e catalase positivos (QUINN et al., 2015). Conforme Leroy, Vermassen e Talon (2016), estas bactérias podem estar presentes em todo lugar, sendo encontrada como comensais na pele e mucosa de seres humanos e animais, mas principalmente podem ser isolados de alimentos, equipamentos e utensílios utilizados na indústria e comércio. Dentro do gênero *Staphylococcus* encontram-se os *Staphylococcus* coagulase positiva - SCP, tendo como principais representantes *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, entretanto *S. aureus* é a principal espécie envolvida nos surtos de intoxicação alimentar, e *Staphylococcus* coagulase negativa – SCN, com particularidades ainda pouco conhecidas em relação a produção de

enterotoxinas em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (PODKOWIK et al., 2013; MORENTE et al., 2016).

O grupo dos SCN, possuem a capacidade de produzir diversos fatores de virulência, dentre os principais, a capacidade de produzir biofilmes, formando um tipo de adesão bacteriana sobre as superfícies, aptidão para produção de potentes enterotoxinas envolvidas nas intoxicações alimentares em humanos, além da possibilidade de expressar genes de resistência antimicrobiana. Assim, dessa forma, a produção desses fatores de virulência podem causar grandes prejuízos a saúde pública, visto que esses microrganismos são contaminantes de uma variedade de alimentos e equipamentos presentes no setor alimentício, além de restringir o uso de antimicrobianos em consequência da resistência (SCHNEIDER, 2017). Diante do exposto, a realização deste trabalho teve como objetivo pesquisar a presença dos genes *blaZ* e *mecA*, relacionados com a resistência a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em *Staphylococcus coagulase* negativa isolados de queijos Mussarela e fatiadores de frios na cidade de Garanhuns- PE

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Origem dos queijos**

A fabricação de queijos é uma das formas mais antigas de conservação do leite, embora haja várias teorias acerca de sua origem, alguns especialistas consideram a Idade Média como sendo o marco de suas primeiras produções, ainda que passagens bíblicas do antigo testamento já relatassem o queijo como alimento da época (PERRY, 2004). Acredita-se que a descoberta do queijo que se conhece atualmente foi feita por um nômade Árabe durante sua travessia pela Ásia, que teria levado como alimento tâmaras secas num cantil feito do estômago seco de um carneiro e um pouco de leite de cabra. Porém quando foi se alimentar do leite, percebeu que o mesmo tinha se transformado em uma massa branca, de sabor agradável, e até os dias atuais a fabricação do queijo é utilizado como uma forma de preservação do leite (ALBUQUERQUE, 2003; PERRY, 2004).

Dentre os povos que utilizavam a produção animal como principal fonte de alimentação, os egípcios foram os primeiros a ver a riqueza existente no leite e nos queijos, utilizando leite de ovelha em grande escala na sua produção. Na Grécia, desde o tempo de Homero, a produção de queijos já era rotina, e embora as terras não fossem muito favoráveis para tal atividade, animais como a cabra e égua eram mais apropriados nessa situação. Na Ásia, como as terras também não eram favoráveis, os povos estavam sempre viajando em busca de terras apropriadas para o rebanho, e logo levaram a produção de queijos até a Europa (ALBUQUERQUE, 2003).

Após alguns anos, essa atividade alcançou um alto padrão, com o aperfeiçoamento da produção e aumento da variedade. A fabricação dos queijos já era realizada em um espaço próprio nas casas, utilizando a técnica de maturação, e servidos nas mais diversas ocasiões, independente da classe (PERRY, 2004).

### **2.2 Produção de queijos**

A partir do século XIX, o consumo de queijo teve um crescimento considerável, tornando-se um alimento de preferência entre a população, e então sua produção passou de artesanal para escala ordem industrial. Com a chegada do século XX, a primeira queijaria foi inaugurada na França e até os dias atuais essa atividade vem ganhando espaço no mundo e no Brasil. Cerca de 1000 tipos de queijos são produzidos, os quais foram adquiridos de novas técnicas de processamento e origem de leites diferentes, aumentando ainda mais a variedade existente no mercado (PERRY, 2004).



### **2.2.1 Produção mundial de queijos**

De acordo com dados da ABIQ, os Estados Unidos são os maiores produtores de queijo do mundo, processando cerca de 5 milhões de toneladas por ano, seguido da Alemanha que produz cerca de 2,5 milhões de toneladas por ano. O Conselho de Exportações de Lácteos dos Estados Unidos, relata que o diferencial do país está nas diversas razões que o mesmo oferece para que os demais países escolham os Estados Unidos para importar, dentre os motivos, um dos principais seria que o país é o maior produtor de leite bovino do mundo, com uma produção constante durante todo o ano, o que faz com que os consumidores encontrem produtos sempre disponíveis (ABIQ, 2018).

Por ano, os Estados Unidos exportam cerca de 368.728 toneladas de queijos, dessas, 45% é importada pela Ásia, 26% pela América do Norte, 10% pelo Oriente Médio e África, 5% importado pela América Central, 4% pela América do Sul e 7% por outros mercados. De fato, o país possui instalações modernas de produção, sempre buscando aumentar ainda mais o padrão de qualidade, o que faz com que a procura por grandes compradores internacionais seja tão consistente no país (ABIQ, 2018).

Dos milhares de tipos de queijos existentes, a França produz cerca de 400 deles, dentre os mais consumidos e saborosos do mundo, destacam-se os queijos Gouda, que representa 50 a 60% do consumo total, seguido do queijo Brie, Parmesão, Manchego, Feta, Cheedar e Camembert (FILHO, 2019).

### **2.2.2 Produção de queijos no Brasil**

O Brasil produz aproximadamente 34 bilhões de litros de leite por ano, desse total, 46% (11 bilhões) são destinados para produção de queijos no país. Segundo a ABIQ, queijos como Mussarela, Prato e o Requeijão Culinário, já são considerados grandes commodities para o país. A região de Minas Gerais concentra cerca de 36% de todas as indústrias de laticínios do Brasil que possuem registro no Serviço de Inspeção Federal - SIF, seguida de São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul (ABIQ, 2016).

Apesar disso, essa produção ainda é insuficiente para suprir as exigências do mercado brasileiro. Em 2015, o Brasil gastou cerca de US\$ 95,6 milhões com a importação de queijos. Países como a Argentina, Uruguai, Holanda, França, Itália e Alemanha contribuíram para as 21.550 toneladas da variedade de queijos importadas pelo Brasil, dentre eles o queijo Mussarela (ABIQ, 2016). Ainda assim, o país exporta uma quantidade relativamente baixa, comparada com outros países, sendo que essas exportações somaram US\$ 10,8 milhões em 2015, e dentre

os principais países que importam os queijos brasileiros, estão o Chile com 39% das importações, o Paraguai com 13% e Taiwan com 12% (BALDE BRANCO, 2016).

No Brasil, são fabricados cerca de 70 tipos de queijos, dentre eles, a Mussarela ocupa 30% do mercado, seguido do queijo Prato com 20%, o Requeijão com 7,5% e o queijo Minas Frescal representando 6% da produção total brasileira (JOLY, 2018).

### **2.3 Importância do queijo como nutriente**

O queijo é o principal derivado do leite, formado pelas partículas, lascas ou pedaços de coalhada a depender da sua composição, tipos de leites, processos aplicados e microrganismos utilizados na fermentação (LAMICHHANE et al., 2018). Por sua vez, para ser utilizado na fabricação de produtos lácteos o leite deve ser de boa qualidade, apresentando-se de cor branca, odor suave e gosto levemente adocicado, obtido através da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea bem alimentada e em perfeito estado físico e psicológico (EMATER, 2012).

Em sua composição, os queijos são ricos em proteínas, dentre elas as caseínas são ditas como as principais, que compõem os queijos estruturalmente e estão presentes em forma de uma rede matriz no produto, constituídas de forma intercalada por solutos dissolvidos como, lactose, ácido lático, sais solúveis e peptídeos, bem como por glóbulos de gordura, água e minerais (LAMICHHANE et al., 2018). Além disso, esse tipo de alimento possui uma diversidade de lipídios, que influenciam no sabor e consistência do queijo, proteínas, importantes minerais como o cálcio e o fósforo e vitaminas do complexo B, todos em prol da saúde dos consumidores (EMATER, 2012).

A Organização Mundial de Saúde - OMS, reconhece a importância dos queijos como promotor de saúde dos consumidores e recomenda que desde a infância pode ser consumido. Durante o crescimento de uma criança, o consumo de queijos pode ajudar no desenvolvimento de ossos, dentes, cartilagens e auxiliar na prevenção de cárie. Quando adolescentes, torna-se uma importante fonte de cálcio e na vida adulta auxilia na prevenção de osteoporose, sendo fundamental para suprir a necessidade dos minerais aos idosos (ABIQ, 2006).

### **2.4 Queijo Mussarela**

A Mussarela é o tipo de queijo mais produzido no Brasil, tendo sua origem na região de Battipaglia, na Itália, sendo caracterizado como um queijo macio e massa do tipo *Pasta-filata*. O mesmo é utilizado principalmente no preparo de alimentos quentes, como pizzas e

sanduíches, devendo apresentar boas propriedades funcionais, em especial, no que se refere ao fatiamento e derretimento do queijo (COELHO, 2012; JANA e MANDAL, 2011).

Essa variação apresenta uma consistência semi-suave a suave, a depender do conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação; possui uma textura variando de fibrosa, elástica e fechada, com uma coloração de branca a amarelada; o sabor é ácido, ligeiramente picante. Não deve possuir crosta nem olhaduras, porém algumas vezes poderá apresentar aberturas irregulares devido ao processo de enformagem em alta temperatura. É obtido através da filagem da massa, e a coagulação pode ser feita pelo coalho e/ou outras enzimas coagulantes específicas, podendo também sofrer ação de bactérias lácticas apropriadas (BRASIL, 1997; FAO, 2018).

Sua fabricação envolve vários processos, tais como a pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, filagem, enformagem, salga, maturação e embalagem. Com isso, o produto entra em contato com diversos equipamentos e superfícies, aumentando o risco de contaminação por microrganismos e tornando-se de grande interesse à saúde pública, sendo necessário que o mesmo se encontre dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 1997; BRASIL, 2001; MARINHEIRO et al., 2015).

## **2.5 Contaminação por microrganismos nos queijos**

Tendo em vista as características organolépticas dos queijos e sua composição nutricional, os mesmos tornam-se excelentes meios para proliferação de bactérias contaminantes, deteriorantes ou patogênicas, que podem causar infecções ou intoxicações nos consumidores, acarretando em sérios prejuízos econômicos e de saúde pública (MARINHEIRO et al., 2015). A contaminação pode ocorrer durante toda cadeia produtiva do queijo, desde a obtenção de uma matéria-prima de qualidade insatisfatória, deficiência na higiene da ordenha, refrigeração inadequada e atraso na entrega da matéria-prima a indústria (FAGNANI et al., 2013). Durante as etapas do processamento e fabricação do queijo, devido aos utensílios, equipamentos e colaboradores que entram em contato com esse produto e durante o transporte e comercialização do produto fracionado ou fatiado (REGES et al., 2017; KOÇAK KIZANLIK e GÖKSOY, 2018).

Segundo a RDC 12 de 2001 da ANVISA, que dispõe, dentre outros, sobre os requisitos microbiológicos para qualidade do queijo Mussarela, o mesmo deverá apresentar para queijos de média umidade, coliformes a 45°C (máx.  $1 \times 10^3$  UFC/g) e para queijos de muita alta umidade, coliformes a 45°C (máx.  $5 \times 10^2$  UFC/g). Em relação a *Staphylococcus* coagulase positiva, em queijos de média umidade (máx.  $1 \times 10^3$  UFC/g), e para queijos de muita alta

umidade (máx.  $5 \times 10^2$  UFC/g). Preconiza-se ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25g do produto (BRASIL, 2001).

Marinheiro et al. (2015) avaliaram a qualidade microbiológica de queijo Mussarela em peça e fatiado em Pelotas- RS, analisando 40 amostras de queijo, sendo 20 em peça e 20 do produto fatiado. As amostras foram submetidas a contagem de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Observou-se que 12,5% das amostras de queijo fatiado e 5% das amostras de queijo em peça estavam impróprias para o consumo, de acordo com os padrões estabelecidos na legislação supracitada (MARINHEIRO et al., 2015). Frequentemente, *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes são utilizados como indicadores da qualidade higiênico-sanitária nos produtos de origem animal - POA (REGES et al., 2017).

## 2.6 *Staphylococcus* coagulase negativa

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencentes à família *Staphylococcaceae*, são microrganismos mesófilos, crescendo em temperaturas entre 7 e 47,8°C; pH de 4,8 a 9,4 e atividade de água ( $A_w$ ) de 0,83. São caracterizados como Gram-positivos, imóveis, catalase positiva, oxidase negativa, anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos e medem de 0,5 a 1µm (SILVA et al., 2017; MORENTE et al., 2016; KUREKCI, 2016). Além disso, são classificados em dois grupos de acordo com a capacidade de coagular ou não o plasma do coelho: *Staphylococcus* coagulase positiva- SCP e *Staphylococcus* coagulase negativa- SCN (MORENTE et al., 2016). Sendo a coagulase, uma enzima que transforma o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo visível, indicando um fator de patogenicidade desse grupo (SILVA et al. 2017). Além disso, esse microrganismo tem a capacidade de produzir potentes enterotoxinas, responsáveis por causar as intoxicações alimentares em humanos e produzem biofilmes sobre superfícies, mantendo-se protegidas contra ação de detergentes e outras substâncias (MORENTE et al., 2016).

Durante muito tempo, acreditou-se que apenas os SCP, especificamente *Staphylococcus aureus* tinham a capacidade de produzir enterotoxinas. Em contrapartida, os SCN já eram conhecidos por apresentar um impacto positivo em alguns processos de fermentação e características sensoriais dos alimentos fermentados, bem como por realizar o controle de bactérias deteriorantes e patogênicas. Por esta razão, por muitos anos esse grupo foi considerado de menor importância e nos testes laboratoriais, caso fossem classificados como SCN não eram identificados a nível de espécie (PODOKOWIK et al., 2013; LEROY et al., 2016).

Diversos alimentos já foram apontados em intoxicações alimentares estafilocócicas, dentre deles: carne e derivados, leite e derivados, aves e derivados, saladas e sanduíches, bolos e tortas de creme e chocolate, todos caracterizados como alimentos que necessitam de muita manipulação e que são mantidos em temperaturas consideradas elevadas (KURECKI, 2016; MORENTE et al., 2016). Num estudo realizado por Udo et al. (1999), foi constatado a presença de SCN nas mãos dos manipuladores de 50 restaurantes no Kuwait, bem como a produção de enterotoxinas pelas amostras analisadas, indicando que os SCN não estão presentes somente em Produtos de Origem Animal- POA.

## 2.8 Resistência antimicrobiana

A resistência desenvolvida por *Staphylococcus* spp. em relação aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos. Um deles é mediada pela enzima  $\beta$ -lactamase, uma enzima extracelular codificada pelo gene *blaZ*, age causando a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e, conseqüentemente, sua inativação. Outra forma de resistência é diminuindo a afinidade para proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) através do produto do gene *mecA* (LIVEMORE, 2000; FLUIT et al., 2001; NEIHARDT, 2004).

Após a exposição do microrganismo ao antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico, o gene *blaZ* produz uma penicilinase que inativa a droga por meio da clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico. Fatores como localização, cinética, quantidade e condições físico-químicas da  $\beta$ -lactamase agem interferindo em sua capacidade hidrolítica. O gene *blaZ* é considerado o mais prevalente em *Staphylococcus* spp. causadores de doenças em animais (LIVERMORE, 2000; PITKALA et al., 2007). Por outro lado, o gene *mecA*, possui um mecanismo de resistência que age alterando o sítio de ação dos  $\beta$ -lactâmicos. Dentre os antimicrobianos em questão, a meticilina é a resistência mais preocupante, visto que *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA se tornou uma das cepas multirresistentes nas infecções hospitalares, sendo de grande preocupação na saúde pública (RABELO et al., 2014).

A ação dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos através da ligação com as proteínas ligadoras de penicilina, agem através de ligações covalentes, ocasionando a lise das células bacterianas (LIVERMORE, 2000). Essas PBPs são enzimas localizadas na membrana celular que catalisam a etapa final da síntese da parede da bactéria. São consideradas essenciais as PBPs 1, 2 e 3, as mesmas possuem alta compatibilidade através de sítios-alvo com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (TOMASZ et al., 1991). No mecanismo de ação do gene *mecA*, ocorre a produção de uma PBP adicional, chamada de PBP 2a, a mesma é uma proteína codificada por tal gene e possui uma

afinidade menor com os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, resultando na resistência adquirida ao grupo em questão (KURODA et al., 2001).

Uma vez que seja necessário a detecção da enzima  $\beta$ -lactamase pelos microrganismos, pode-se utilizar os métodos fenotípicos ou genotípicos. No caso do teste fenotípico, a técnica colorimétrica de discos de papel de filtro impregnados com a cefalosporina cromógena nitrocefina é bem difundida, porém pode apresentar resultados falso-positivos (PITKALA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2019). Já em relação aos métodos genotípicos, a PCR é a mais utilizada, agindo na amplificação de genes para determinada característica, apresentando maior sensibilidade e especificidade quando comparados aos testes fenotípicos. Porém a detecção do gene não significa necessariamente que ele está sendo ou será expresso pelo microrganismo (PEREIRA et al., 2014; ROBLES et al., 2014).

## **2.9 Importância de *Staphylococcus coagulase negativa* em Saúde Pública**

Os microrganismos *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) por muitos anos foram considerados menos importantes frente a contaminação de alimentos, quando comparados ao *S. aureus*. Suas características não patogênicas sempre eram colocadas em destaque e sua participação nas intoxicações alimentares foram negligenciadas (KUREKCI, 2016; MORENTE et al., 2016).

Dentre os mecanismos utilizados por este grupo de microrganismos para a sobrevivência no meio, podemos destacar a produção de biofilmes. O biofilme, consiste na adesão dos microrganismos a superfícies sólidas e úmidas com a formação de uma proteção viscosa, onde os microrganismos ali presentes se tornam organizados e protegidos contra a ação de antimicrobianos, sanitizantes e abrasivos (COSTERTON et al., 1999; FRIEDRICZEWSKI et al., 2018).

Além disso, o interesse de estudos em *Staphylococcus coagulase negativa* tem aumentado consideravelmente devido ao crescimento de casos de infecções em humanos e animais causados por esse grupo. Concomitantemente, o uso indiscriminado de antibióticos leva ao surgimento de cepas resistentes as principais drogas utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas (ROLLIM, 2001; CUNHA et al., 2006). Sendo descrito por diversos autores acerca da detecção de cepas que produzem as enterotoxinas e possuem o gene de resistência a antimicrobianos em isolados SCN, aumentando sua importância clínica (BORGES et al., 2008).

Santos (2018) realizou um estudo acerca do perfil de resistência de SCN isolados de queijos coalho em Lagarto- SE, onde dos 45 isolados, 24 apresentaram resistência a um fármaco e 6 apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos, reforçando a possibilidade de tal grupo agir como reservatório de genes de resistência, bem como, servir de veículo dessa resistência para demais espécies.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 85 amostras bacterianas isoladas de queijo Mussarela e fatiadores de frios, incluindo nove espécies de SCN e amostras de *Staphylococcus* spp. (Tabela 3). Os isolados fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunodiagnóstico (LAPEMI) da Central de Laboratórios da UFRPE-UAG (CENLAG), tendo sido coletados, isolados e identificados em estudo anterior (LEITE, 2019). Após a identificação, os isolados bacterianos foram mantidos congelados a -70°C em meio criopreservador. Os isolados foram descongelados e reativados em ágar cérebro coração- BHI para a realização de extração de DNA e análise dos genes por PCR.

**Tabela 3. Frequência absoluta e relativa de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de amostras de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores.**

Espécie	Superfície de fatiadores	Queijo Mussarela	Total	
			Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<i>S. saprophyticus</i>	10	12	22	25,9
<i>S. xylosus</i>	8	6	14	16,5
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	3	4	7	8,2
<i>S. epidermidis</i>	1	3	4	4,7
<i>S. warneri</i>	2	1	3	3,5
<i>S. captis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	1	0	1	1,2
<i>S. chromogenes</i>	0	1	1	1,2
<i>S. caprae</i>	0	1	1	1,2
<i>S. simulans</i>	0	1	1	1,2
<i>Staphylococcus</i> spp.*	17	14	31	36,5
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>85</b>	<b>100</b>

\*isolados não identificados a nível de espécie pelos testes bioquímicos utilizados.

#### 3.2 Análises dos genes *blaZ* e *mecA*

##### 3.2.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

Para a extração e purificação do DNA genômico utilizou-se, com modificações, a metodologia do aquecimento descrita por Hassanzadeh et al. (2016). Dessa forma, os isolados foram inoculados em caldo nutritivo (Tryptic Soy Broth, Himedia, Índia) e incubados overnight a 37°C. O DNA foi obtido a partir de 1mL do cultivo bacteriano, o qual foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µL de tampão de lise (20 mM EDTA + 20



mM Tris pH 7,5 + 75 mM NaCl) e recentrifugado; as células bacterianas foram suspensas novamente em 300 µL do mesmo tampão e submetidas a dois ciclos de fervura/congelamento, sendo 2 minutos cada etapa. Em seguida, adicionou-se 30 µL de lisozima (1mg/mL), incubou-se por 1 hora a 37°C quando foi adicionado 33 µL de SDS 10% e 120 µL de AcNa 3M, incubando-se as amostras a 55°C e/ou ambiente gelado, após adição de cada um dos reagentes. Realizou-se, então, centrifugação e o sedimento foi submetido a etapas consecutivas de clorofórmio, isopropanol e etanol. Após a última lavagem com etanol gelado a 70% (v/v), os tubos foram secos por inversão e o DNA ressuspense em 30 µL de tampão TE pH 7,5. Adicionalmente, a integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de eletroforese a 1%.

### 3.2.2 Reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR Multiplex)

As sequências dos iniciadores utilizados neste estudo para amplificar segmento específico dos genes *blaZ*, *mecA* e 16S, bem como os autores que as utilizaram em outros estudos, estão demonstradas na Tabela 4.

Inicialmente foi realizada PCR convencional com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *16S* para avaliar a qualidade do DNA extraído e presença de possíveis inibidores. Dessa forma, segmento específico do gênero *Staphylococcus* foi amplificado preparando-se uma reação com volume final de 30 µL, composta por 27 µL do mix para PCR (Invitrogen, USA), 1 µL (10 nM) de cada iniciador e 1 µL de DNA (correspondendo aproximadamente a 197 ng). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler® Pro, Eppendorf) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94 °C-5 minutos, seguindo-se 36 ciclos (desnaturação 94 °C-45 segundos; pareamento 55 °C-30 segundos; extensão 72 °C-30 segundos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para a PCR Multiplex foi preparada uma reação com os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores: *mecAF/mecAR* e *blaZF/blaZR*, sendo 0,25 µL (25pM) de cada iniciador *mecA*; 0,4 µL (40 pM) de cada iniciador *blaZ*; 2 µL do mix para PCR Multiplex (Solis, Biodyne, Estônia) e 0,5 µL de DNA molde (correspondendo a aproximadamente 98,5 ng). O volume foi ajustado para 10 µL com água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler® Pro, Eppendorf) com os seguintes ciclos: ativação inicial a 95 °C-12 minutos; desnaturação inicial a 94 °C-5 minutos, seguindo-se 36 ciclos (desnaturação 94 °C-45 segundos; pareamento 50,2 °C-30 segundos; extensão 72 °C-30 segundos) e extensão final a 72 °C-10 minutos. Em todos os testes foram incluídos controle positivo (amostra de DNA de *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus*, cepa K22H/RJ, positiva para os genes *blaZ* e *mecA*) e controle negativo (reação sem DNA).

**Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado e referência.**

<b>Produto de PCR</b>	<b>Sequência do Iniciador</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>16S</i>	F – 5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3'	228	Monday; Boahach (1999)
	R – 5'-CGC ACA TCA GCG TCA G-3'		
<i>blaZ</i>	F – 5'-AAG AGA TTT GCC TAT GCT TC-3'	517	Sawant et al., (2009)
	R – 5'-GCT TGA CCA CTT TTA TCA GC-3'		
<i>mecA</i>	F – 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'	310	Fontes et al., (2013)
	R – 5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3'		

### 3.2.3 Eletroforese e visualização dos produtos amplificados

A separação dos amplicons foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado com tampão Tris-acetato e EDTA e, em seguida, corado (SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain, Invitrogen). O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 volts por 60 minutos. A visualização e registro fotográfico foram realizados em transiluminador (DyNA Light UV transilluminator, LABnet).

### 3.3 Teste de reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos produtos de PCR foi testada analisando-se os DNAs de 10 amostras selecionadas ao acaso do total das estudadas, mais o DNA da cepa controle positivo. Foram realizadas reações de amplificação durante três dias (reprodutibilidade entre testes).

### 3.4 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva para demonstrar a frequência dos genes *blaZ* e *mecA* nas amostras investigadas.

### 3.5 Produção da enzima $\beta$ -lactamase

Para a pesquisa da enzima  $\beta$ -lactamase foi utilizada a técnica colorimétrica dos discos de papel de filtro impregnados com a cefalosporina cromógena nitrocefina (CEFINASE DISCS<sup>®</sup>; Becton, Dickinson and Company; USA). Para a realização das análises foram seguidas as recomendações do fabricante: os isolados bacterianos foram cultivados em ágar tripton de soja (TSA – OXOID LTDA<sup>®</sup>; England) e, posteriormente, incubados a 37°C overnight. Os discos de nitrocefina foram distribuídos sobre lâmina de microscopia, umedecidos com 30  $\mu$ L de água purificada estéril e, em seguida, as colônias bacterianas a serem testadas

foram espalhadas sobre os discos com auxílio de alça bacteriológica estéril. Após a deposição das colônias sobre os discos, estes novamente foram umedecidos com uma gota de água purificada estéril. A interpretação foi realizada nos primeiros 5 minutos de contato da bactéria com o disco, sendo a mudança de cor indicativa de reação positiva, ou seja, os discos apresentavam mudança de cor amarela para vermelha, na presença da enzima. As amostras demonstrando reação negativa foram deixadas em temperatura ambiente por uma hora, quando foi realizada a leitura final do teste. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente (PITKÄLÄ et al., 2007). As análises foram realizadas por Mendonça et al. (2019).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 85 amostras analisadas, 67,06% (57 amostras) foram positivas para os genes *blaZ* e *mecA*, enquanto que 32,94% (28 amostras) foram negativas para estes genes (Tabela 5). Dos isolados com resultados positivos, 37,65% (32/85 amostras) foram positivas apenas para o gene *blaZ*, 3,52% (3/85 amostras) apresentaram amplificação para o gene *mecA* e em 25,89% (22/85 isolados) foi verificada a presença de ambos os genes avaliados.

**Tabela 5. Frequência absoluta e relativa dos genes *blaZ* e *mecA* detectados em *Staphylococcus coagulase negativa* isolados de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores em Garanhuns-PE.**

Gene	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>blaZ</i>	32	37,65%
<i>mecA</i>	3	3,52%
<i>blaZ+mecA</i>	22	25,89%
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>67,06%</b>

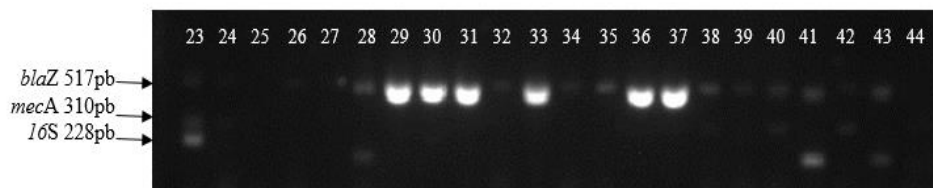
Dos isolados com resultados positivos, 37,65% (32 amostras) amplificaram apenas o gene *blaZ* (Figura 12), resultado semelhante ao encontrado por Lúcio et al. (2013) em um estudo sobre os genes *mecA* e *blaZ* em 100 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina na microrregião de Garanhuns, onde foram encontradas 36 amostras positivas para o gene *blaZ*. Já Martini et al. (2017) em sua pesquisa sobre resistência antimicrobiana a penicilina e tetraciclina em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais, encontraram resultados elevados de 97,7% (88/90) dos isolados com positividade para o gene *blaZ*, indicando que tais isolados agem causando a hidrólise enzimática do núcleo  $\beta$ -lactâmico e conseqüentemente tornam-se resistentes a ação de tais fármacos.

Em relação ao gene *mecA*, dos 85 isolados testados foram verificados amplificação em 3,52% (3/85 amostras) (Figura 13). Resultado equivalente ao que Soares et al. (2012) encontraram em seu trabalho sobre resistência antimicrobiana e detecção dos genes *mecA* e *blaZ* em *Staphylococcus coagulase negativa* isolados de mastite bovina em 25 propriedades de gado leiteiro da região do Rio de Janeiro, onde das 100 amostras analisadas apenas 4% (4/100) apresentaram amplificação para o gene *mecA*.

Além disso, no presente trabalho foi verificada a prevalência de 25,89% (22/85 isolados) positivos para ambos os genes avaliados, isso pode ser explicado pela possibilidade dos genes *mecA* e *blaZ* estarem presentes no cromossomo e muitas vezes serem detectados em conjunto (LIVERMORE, 2000; MENDONÇA et al., 2012).



**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos genes *blaZ* e *mecA* por PCR multiplex. 1- marcador de peso molecular; 2- controle positivo; 3- *blaZ* e *mecA*; 4- *blaZ*; 5- *blaZ*; 6- *blaZ*; 7- *blaZ* e *mecA*; 8- *blaZ* e *mecA*; 9- *blaZ* e *mecA*; 10- *blaZ* e *mecA*; 11- *blaZ* e *mecA*; 12- *blaZ* e *mecA*; 13 e 14- *mecA*; 15- *blaZ*; 16- negativo; 17- *blaZ* e *mecA*; 18- negativo; 19 a 22- *blaZ* e *mecA*.

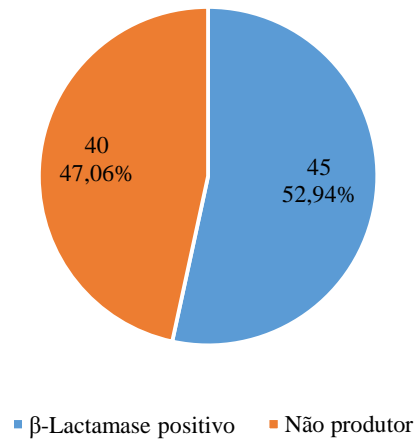


**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos genes *blaZ* e *mecA* por PCR multiplex. 23- marcador molecular; 24- *blaZ* e *mecA*; 25- negativo; 26- *blaZ*; 27- negativo; 28 a 37- *blaZ*; 38- *blaZ* e *mecA*; 39- *blaZ*; 40- *blaZ* e *mecA*; 41- *blaZ*; 42- *blaZ* e *mecA*; 43- *blaZ*; 44- controle negativo.

Em contrapartida, as mesmas amostras oriundas de queijo Mussarela e fatiadores de frios foram testadas quanto a produção da enzima  $\beta$ -lactamase, do total das 85 amostras, 52,94% (45/85) foram positivas e 47,06% (40/85) foram negativas quanto a produção desta enzima (Figuras 14 e 15).



**Figura 14.** Padrão e alteração de cor dos discos Cefinase para detecção de  $\beta$ -Lactamase. A- Reação positiva; B- Reação negativa.



**Figura 15.** Isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* produtores e não produtores de β-lactamase pelo método fenotípico.

Dos isolados positivos para produção de β-lactamase, 18,82% (16/85) das amostras foram produtoras da enzima, porém não amplificaram os genes *blaZ* e *mecA*. Por sua vez, Robles et al. (2014), realizaram um estudo para detecção de β-lactamase em *S. aureus* e SCN isolados de mastite, e observaram que vários de seus isolados não abrigavam o gene *blaZ* e nos testes fenotípicos mostraram atividade de produção da enzima. Isso se dá em razão de que o fenótipo β-lactamase pode ser resultado da expressão de mais de um gene, ou ainda, pelo fato de haver mais de um mecanismo que confere resistência a tal grupo de microrganismos, que não a expressão do gene *blaZ* (MALIK et al., 2007)

Em contrapartida, 18,82% (16/85) das amostras positivas para o gene *blaZ* através da PCR, também foram positivas quanto a produção da enzima pelo método fenotípico e 26,67% (12/85) das amostras que foram positivas para os dois genes em questão pelo método genotípico, também foram positivas quanto a produção da β-lactamase. Em relação ao gene *mecA*, 1,18% (1/85) das amostras que amplificaram o gene foram positivas para a produção da enzima *in vitro*, isso pode ser decorrente de fatores como a qualidade do DNA, a não amplificação do gene *blaZ*, dentre outros (Tabela 6).

É importante ressaltar que a resistência a antimicrobianos β-lactâmicos não é conferida somente ao mecanismo de produção da enzima, porém outros mecanismos de resistência a essa classe, como, a transferência de material genético, podem levar ao aparecimento de cepas resistentes. Essa passagem de genes pode ocorrer por processos de transformação, transdução ou conjugação, bem como pela passagem de DNA pela lise da bactéria, plasmídeos, transposons ou fagos (LEE e PARK, 2016; JO et al., 2017).

**Tabela 6. Frequência absoluta e relativa de *Staphylococcus* coagulase negativa produtores da enzima  $\beta$ -lactamase de acordo com a presença dos genes *blaZ* e *mecA*.**

Gene	$\beta$ -lactamase	
	Frequência	Frequência
	Absoluta	Relativa
<i>blaZ</i>	16	18,82%
<i>mecA</i>	1	1,18%
<i>blaZ+mecA</i>	12	14,12%
<i>blaZ<sup>-</sup>/mecA<sup>-</sup></i>	16	18,82%
<b>Total Positivas</b>	45	52,94%

<sup>-</sup> Negativo para os genes *blaZ* e *mecA*.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível verificar a presença dos genes *blaZ* e *mecA* em *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijo Mussarela e fatiadores de frios. Os resultados obtidos através do método fenotípico quanto a produção de  $\beta$ -lactamase, em consonância com os achados genotípicos são de suma importância para saúde pública, uma vez que esses genes de virulência estão relacionados a resistência a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, os quais são os principais utilizados em casos de infecções por *Staphylococcus*. Além disso, esses genes podem ser transmitidos para outros microrganismos não pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Por fim, os dados apresentados nesse estudo podem auxiliar outros pesquisadores e as autoridades de fiscalização, a tomarem conhecimento sobre a presença de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* coagulase negativa, colocando assim em risco a saúde da população.



## 7. REFERÊNCIAS

- ABIQ. **Associação Brasileira de Indústrias de Queijos**. Disponível em: <<https://www.abiq.com.br/index.asp>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- ALBUQUERQUE, L. C. Os queijos no mundo: o mundo italiano dos queijos. **CT/ILCT/EPAMIG**, v. 3, p. 124, 2003. Acesso em: 24 set. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2001.
- BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, Santa Maria, 2008.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318–1322, 1999.
- CUNHA, M. L. R. S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 70-74, 2006.
- EMATER-MG. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do estado de Minas Gerais. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. p.68, 2012.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Gateway to dairy production and products**. Disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/products/types-and-characteristics/en/>>. Acesso em: 29 ago. 2019.
- FAGNANI, R. et al. Pontos de contaminação microbiológica em Indústrias de Queijo Muçarela. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 35, n. 3, p. 217-223, 2013.
- FILHO, M. C. C. Os **Queijos mais consumidos do mundo**. Disponível em: <https://minutocultural.com.br/os-queijos-mais-consumidos-do-mundo/> . Acesso em: 03 set. 2019.

- FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* v. 14(4), p. 836–871, 2001.
- FRIEDRICZEWSKI, A. B. et al. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. *Acta Scientiae Veterinariae.* v. 46, p. 1528, 2018.
- JANA, A. H; MANDAL, P. K. Manufacturing and quality of Mozzarella cheese: A Review. *International Journal of Dairy Science.* v. 6, p. 199-226, 2011.
- JO, A.; DING, T.; AHN, J. Comparison of antibiotic resistance phenotypes in laboratory strains and clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Food Science and Biotechnology*, v. 26, n. 6, p.1773–1779, 2017.
- KOÇAK KIZANLIK, P.; GÖKSOY, E. O. Microbiological quality evaluation of various types of cheese. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine.* v. 15, n. 2, p. 86-93, 2018.
- KUREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cheese samples in Turkey. *Journal Dairy Science.* v. 99, p. 1-5, 2016.
- KURODA, M. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* 319:157-61, 2001.
- LAMICHHANE, P.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J.J. Invited review: Structure-function relationships in cheese. *Journal Dairy Science.* v. 101, p. 1-18, 2018.
- LEE, Y. D.; PARK, J. H. Phage Conversion for  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* from Foods. *Journal of Food Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 263–269, 2016.
- LEITE, A. E. L. M. **Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa em Utensílios e Queijos Mussarela Fatiados Comercializados em Garanhuns-PE e Sua Capacidade de Formar Biofilme.** Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.
- LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. *Staphylococcus*: Occurrence and properties. *Encyclopedia of Food and Health.* p. 140-145, 2016.
- LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* v.16 (supl. 1). p. 3-10, 2000.
- LÚCIO, E. C. et al. Pesquisa dos genes *mecA* e *blaZ* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina na microrregião de Garanhuns. **XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, JEPEX, 2013.

- MARINHEIRO, M. F.; GHIZZI, G. L.; CERESER N. D.; LIMA H. G.; TIMM, C. D. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 36, n. 3, p. 1329-1334, Londrina, Brasil, 2015.
- MARTINI, C. L. et al. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, p. 1-4, 2017.
- MENDONÇA, E. C. L. et al. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012.
- MENDONÇA, K. S.; LEITE, A. E. L. M.; LUCAS, A. P.; MENDONÇA, M.; SILVA, E. R. Detecção de  $\beta$ -lactamase por *Staphylococcus* coagulase negativo isolados de queijo mussarela fatiados e fatiadores de frios. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo: Higiene Alimentar, v. 33, p. 1821-1824, 2019.
- MORENTE, E. O.; RUIZ, A. G. P.; PULIDO, R. P. *Staphylococcus*: Detection. Encyclopedia of food and health. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 128-132, 2016.
- NEIHARDT, F. **Bacterial genetics**. Em McGraw Hill (Eds.), Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases. 4<sup>a</sup> ed, p. 53-74, Nova Iorque, 2004.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2015.
- PEREIRA, L. A. et al. Real -Time PCR Assay for Detection of *blaZ* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1259–1261, 2014.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, Belo Horizonte – MG, 2004.
- PITKÄLÄ, A. et al. Comparison of tests for detection of  $\beta$ -Lactamase-Producing *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 6; v. 45; p. 2031–2033; 2007.
- PODKOWIK, M. et al. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococci*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 163, p. 34-40, 2013.
- RABELO, M. A. et al. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 47, n. 4, 2014.
- REGES, J. T. A. et al. Qualidade microbiológica e físico química do queijo mussarela a granel comercializadas em Jataí (Goiás, Brasil). **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**. v. 4, p. 69-77, 2017.

- ROBLES, B. F. et al. Detecção de beta-lactamase em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de mastite bovina. **Pesq. Veterinário. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 325-328, 2014.
- SANTOS, R. O. **Perfil de resistência de *Staphylococcus coagulase negativa* isoladas de queijos coalho comercializados no município de Lagarto- SE.** Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2018.
- SCHNEIDER, M. F.; MELLO, F. D.; FERRAZ, S. M. Pesquisa do gene *mecA* de resistência a meticilina, de genes codificadores de enterotoxinas, do Gene *tst-1* e detecção da similaridade genética entre os *Staphylococcus sp.* isolados do Leite e do queijo artesanal serrano. **Seminário de Iniciação Científica, Universidade do Estado de Santa Catarina**, 2017.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 5º Ed., Blucher, 560 p. , 2017.
- SILVA, J. G.; ALCANTARA, A. M.; MOTA, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus spp.* resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 223-228, 2018.
- SOARES, L. C. et al. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n.8, p.692-696, 2012.
- TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression methicillin-resistant clinical isolated of staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.124-129, 1991.
- UDO, E. E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative *Staphylococci* in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 819-823, 1999.
- VERAS, J. F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 12, p. 410-415, 2008.