UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de virulência, adesão e invasão *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas

FABIAN CAMILO NIÑO ARIAS

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de virulência, adesão e invasão *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Fabian Camilo Niño Arias
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Niño Arias, Fabian Camilo

Estudos de virulência, adesão e invasão *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas, 2017.
77 p. : il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: De Martinis, Elaine Cristina Pereira.

1. Queijo Minas. 2. Virulência. 3. Adesão e invasão celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabian Camilo Niño Arias

Estudos de virulência, adesão e invasão *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

NIÑO-ARIAS, F. C. **Estudos de virulência, adesão e invasão *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas**. 2017. 077f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Staphylococcus aureus é um micro-organismo amplamente adaptável, assim, pode viver em uma grande variedade de ambientes, inclusive nos alimentos. Dentre as toxi-infecções alimentares de origem bacteriana relatadas, cerca de 50% estão relacionadas com a produção de enterotoxina estafilocócica. No Brasil, o queijo Minas frescal é o tipo de queijo mais consumido (aproximadamente 30g/pessoa/dia) e a ocorrência desta bactéria é alta em queijos artesanais. Para este estudo, foram obtidos isolados de *S. aureus* produtores de enterotoxina e foram selecionados também dez isolados bacterianos, como microbiota acompanhante de uma amostra de queijo Minas. Foi avaliada a atividade inibitória da microbiota acompanhante frente a *S. aureus*, por meio de testes de antagonismo em ágar. Dentre as bactérias testadas, um isolado de *Leuconostoc mesenteroides* MC5 e um isolado de *Lactococcus lactis* MC5 mostraram atividade antiestafilocócica. Foi realizado também teste em ágar, com utilização de proteases, para avaliação da natureza proteica do inibidor, que seria indicativa da presença de bacteriocinas. Esses compostos são de grande interesse para bioconservação de alimentos e, neste trabalho, foi verificada a natureza proteica do (s) inibidor (es) produzido (os) por *L. lactis*. A persistência de *S. aureus* no ambiente de produção de alimentos derivados de leite depende, em parte, de sua capacidade de adesão e invasão em células eucarióticas, causando mastite em gado leiteiro. Além disso, *S. aureus* é um importante patógeno nosocomial, com potencial para causar além de gastroenterite por produção de enterotoxinas, quadros de infecção em outros sítios anatômicos. Desse modo, foi avaliada também neste trabalho, a capacidade de adesão e invasão de um isolado selecionado de *S. aureus* isolado de queijo Minas, utilizando como modelo cultura de células eucarióticas das linhagens Hep-2 e Caco-2. Para este ensaio, culturas de células eucarióticas foram infectadas com *S. aureus* em combinação com *L. lactis* MC5 e/ou *L. mesenteroides* MC5, bem como foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato bruto da cultura de *L. lactis* MC5 (sobrenadante livre de células - SLC). Os resultados dos testes de adesão-invasão foram altamente dependentes da cultura celular avaliada e das condições experimentais relativas ao metabolismo bacteriano e da célula hospedeira. Finalmente, foram selecionados genes importantes para a virulência de *S. aureus* (*hla*, *icaA* e *sea*) para estudos de expressão gênica por meio da técnica de PCR em tempo real, demonstrando diferenças significativas na expressão dos três genes quando testados em diferentes condições de cultivo, o que poderia sugerir que o potencial virulento de *S. aureus* está diretamente relacionado a condições ambientais e locais de isolamento, com implicações importantes para a garantia da inocuidade de alimentos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, laticínios, virulência, adesão e invasão de células eucarióticas, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

NIÑO ARIAS, F. C. **Virulence studies, *in vitro* adhesion and invasion of *Staphylococcus aureus* isolated from Minas cheese.** 2017. 077p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Staphylococcus aureus is a widely adaptable microorganism, it can live in a wide variety of environments including food. Among the bacterial foodborne reports, about 50% are related to the enterotoxins production. In Brazil, Minas frescal cheese is the most consumed cheese type (approximately 30g / person / day) and the occurrence of this bacterium is high in artisanal cheeses. For this study, isolates of *S. aureus* enterotoxin producer were obtained and ten bacterial isolates were selected such as microbiota from a Minas cheese sample. The inhibitory activity of the microbiota against *S. aureus* was evaluated by antagonism agar tests. Among the bacteria tested, one isolate of *Leuconostoc mesenteroides* and one isolate of *Lactococcus lactis* showed antiesthetikococcal activity. Agar test using proteases, was also carried out to evaluate the protein nature of the inhibitor, which would be indicative of bacteriocin production. These compounds have a great interest for food bioconservation; in this work was determined the protein nature of the inhibitor (s) produced by *L. lactis*. The persistence of *S. aureus* in the milk-derived food production environment depends, in part, on its capacity for adhesion and invasion in eukaryotic cells, causing mastitis in dairy cattle. In addition, *S. aureus* is an important nosocomial pathogen causing of gastroenteritis by enterotoxin production and infection in other anatomical sites. Thus, the capacity of adhesion and invasion of a selected isolate of *S. aureus* isolated from Minas cheese, using a Hep-2 and Caco-2 models of eukaryotics cells cultures was also evaluated. For this assay, eukaryotic cell cultures were infected with *S. aureus* in combination with *L. lactis* and/or *L. mesenteroides*, as well the antimicrobial activity of crude extract from *L. lactis* (cell free supernatant - SLC). The results of the adhesion-invasion tests were highly dependent on the assessed cell culture and experimental conditions concerning bacterial and host cell metabolism. Finally, important *S. aureus* virulence genes (*hla*, *icaA* and *SEA*) were selected for the study of gene expression through the real-time PCR technique demonstrating significant differences in the expression of the three genes when tested in the different media, which could suggest that the virulent potential of *S. aureus* is directly related to environmental and local conditions of isolation, with important implications for food safety assurance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, dairy products, virulence, cell culture, inhibitory activity.

Introdução

Leite e derivados constituem parte importante da dieta da maioria da população e, dentro desta categoria de alimentos, encontra-se o queijo frescal - um dos derivados lácteos artesanais mais produzidos no mundo. Sua composição, rica em proteínas, carboidratos, gorduras, sais, lactose e sua alta atividade de água, oferecem condições favoráveis para o crescimento de diversos micro-organismos, tanto patogênicos quanto não patogênicos (DA SILVA et al., 2013).

Dentre os micro-organismos não patogênicos encontram-se as bactérias ácido lácticas (BAL), que desempenham um papel primordial no processo de fermentação do leite, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos. As BAL são capazes de produzir ácido láctico rapidamente, ocasionando uma diminuição do pH do leite e a remoção da fonte fermentescível, promovendo um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (WIDYASTUTI; FEBRISANTOSA, 2014, HOSSEIN et al., 2015). Além disso, essas bactérias produzem determinados compostos antagônicos de origem protéica, formados em pequenas quantidades a partir do metabolismo celular, dentre os quais podemos citar as bacteriocinas (PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014). Algumas bacteriocinas são ativas frente a micro-organismos indesejáveis em alimentos, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* entre outros (YANG et al., 2014; EBBENGAARD et al., 2015). Além de bacteriocinas, são produzidos outros compostos extracelulares com propriedades antagonistas, tais como ácidos orgânicos, diacetil e peróxido de hidrogênio, entre outros, que podem ter ação frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (BERMUDEZ-BRITO et al., 2013, DAVIDSON; TAYLOR; SCHMIDT, 2013).

***Staphylococcus aureus* nos alimentos**

S. aureus é encontrado naturalmente no meio ambiente e também faz parte da microbiota humana e animal, fazendo parte da microbiota da pele, nariz, faringe, boca, saliva e trato digestivo e respiratório (BOUMLIL et al., 2016). A intoxicação

causada por este micro-organismo é oriunda da contaminação de alimentos por enterotoxinas termoestáveis, sendo resistentes ao cozimento. Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana, cerca de 45% estão relacionadas com esta bactéria (RATTI; SOUZA, 2009, TONG et al., 2015). A intoxicação manifesta-se após um curto período de incubação (1 - 6 horas), sendo caracterizada por náusea, vômito, dores abdominais e diarreia (AYDIN; SUDAGINAN; MURATOGLU, 2011).

S. aureus é um organismo amplamente adaptável e pode viver em uma grande variedade de meios e em superfícies, formando biofilmes (TONG et al., 2015). A produção de biofilmes é reconhecida como um fator importante que contribui para a persistência de bactérias do gênero *Staphylococcus* em superfícies de equipamentos e instalações de processamento de alimentos (KHORAMIAN et al., 2015). A presença desta bactéria no leite e derivados pode ser decorrente da ordenha de animais com mastite ou ainda, pode provir de uma contaminação secundária, a partir da pele e fossas nasais de manipuladores ou por condições higiênico-sanitárias insatisfatórias da água e de utensílios empregados na ordenha (PEARCE et al., 2012).

***Staphylococcus aureus* em queijos artesanais**

Muitos queijos artesanais, incluindo o tipo Minas, são tradicionalmente produzidos com leite cru, o que aumenta drasticamente riscos de contaminação por micro-organismos patogênicos; a lei estadual No. 20.549 de 18/12/2012 do estado de Minas Gerais dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, permitindo a produção deste tipo de queijos a partir de leite cru devido a ser um produto elaborado tradicionalmente no Brasil com leite de vaca, sem tratamento térmico de massa. Além disso, a produção de enterotoxinas termoestáveis por *S. aureus* aumenta o risco ocorrência de toxi-infecções alimentares, se não forem adotadas medidas de controle desde os primeiros estágios de produção de laticínios, ainda que o leite seja pasteurizado (FERREIRA et al., 2011; MORAES et al., 2009). Estudos realizados na Europa e no Brasil demonstraram a grande ocorrência de *S. aureus* produtores de enterotoxinas em queijos artesanais,

sendo 38% na Suécia, 61% na Itália e 70% no Brasil (CREMONESI et al., 2007, GOMES; FRANCO; DE MARTINIS, 2013, RODRIGUEZ et al. 2011).

No Brasil o "Minas" é o queijo tipo mais consumido (aproximadamente 30 g/pessoa/dia) e este produto apresenta condições favoráveis para a multiplicação microbiana, com umidade acima de 45,9 %, pH entre 5 e 6, além de sua composição altamente nutritiva (MENEZES; DUTRA, 2017).

Isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) do complexo clonal 1 (CC1)

Depois da descoberta da penicilina, a qual funcionou muito bem como agente antimicrobiano até a década de 1960, começaram a aparecer isolados de *S. aureus* resistentes. Em seguida, foi sintetizado o beta-lactâmico meticilina, que não era afetado pelas beta-lactamases, enzimas produzidas por *S. aureus* e que eram responsáveis pela degradação e ineficácia da penicilina. Entretanto, logo houve também relatos da ocorrência de bactérias resistentes a esse novo antimicrobiano, sendo estes isolados denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina - MRSA (MIAO et al., 2017).

Desse modo, métodos para tipagem subespécie aplicados ao estudo de isolados de *S. aureus* são ferramentas epidemiológicas essenciais na prevenção e controle de infecções. Sistemas de tipagem tradicionais baseados em tipagem fenotípica, tais como sorotipagem, biotipagem, fagotipagem, ou testes de susceptibilidade a antimicrobianos têm sido bastante utilizados mas, métodos mais recentes que examinam a relação dos isolados a nível molecular revolucionaram a capacidade de diferenciação entre os tipos e subtipos bacterianos (SABAT et al., 2013).

Multilocus sequence typing (MLST) é uma das ferramentas mais utilizadas para identificação de subtipos bacterianos, a metodologia foi descrita por Maiden e colaboradores em 1998 e tem sido utilizada para identificação epidemiológica de diferentes micro-organismos, incluindo *S. aureus*. Essa técnica se baseia no sequenciamento de 7 genes *housekeeping* de cada amostra a ser avaliada e as sequências são depositadas em banco de dados *online*, sendo que cada sequência corresponde a um alelo. Sequências diferentes dão origem a alelos diferentes e o

conjunto de alelos de cada amostra bacteriana origina um *sequence typing* (ST) que são finalmente classificados em complexos clonais (CC) e utilizados para análises epidemiológicas, filogenéticas, populacionais e evolucionárias (MAIDEN et al., 1998).

O complexo clonal um (CC1) é um dos mais importantes das espécies de *S. aureus*, sendo preocupante porque todas as linhagens deste grupo são produtoras de enterotoxina e também, porque engloba linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). O CC1 tem sido identificado em diferentes partes do mundo em amostras provenientes de humanos, de ambiente e de alimentos (RABELLO et al., 2007, MONECKE et al., 2011, DABUL; CAMARGO, 2014, PLANET et al., 2017, THAPALIYA et al., 2017).

Fatores de virulência em *S. aureus*

O mecanismo das toxi-infecções causadas por *S. aureus* envolve a produção de varios tipos de enterotoxinas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEH); as enterotoxinas estafilocócicas são peptídeos pequenos (26-29 kDa) secretados durante o crescimento bacteriano na matriz alimentar. A intoxicação por enterotoxinas é a segunda causa mais associada a doenças de origem alimentar. As enterotoxinas interferem na função intestinal e tipicamente causam gastroenterite aguda com vômitos e diarreia (MEHROTRA; WANG; JONHSON, 2000).

Estas toxinas são consideradas superantígenos, pois estimulam células T de forma não específica, sem qualquer reconhecimento específico de antígeno. Numa resposta antigênica normal, apenas uma célula T numa população de cerca de 10.000 é estimulada, mas no caso um superantígeno, uma de cada cinco células T é estimulada, levando a uma enorme liberação de citocinas, permitindo interação do principal complexo de histocompatibilidade (MHC) da classe II com receptores de células T. Os mecanismos pelos quais as enterotoxinas estafilocócicas atuam não são bem conhecidos, mas podem incluir a ativação da liberação de citocinas, causando morte celular por apoptose (OTTO, 2014).

Além da intoxicação alimentar mediada por toxinas pré-formadas nos alimentos, *S. aureus* também pode causar infecções humanas, quando a contaminação ocorre por outras vias. Nesse último caso, diversos outros fatores de

virulência estão envolvidos, tais como hemolisinas, leucocidinas, proteases, toxinas esfoliativas e fatores imuno-moduladores. A patogenicidade desta bactéria depende da expressão de proteínas de superfície importantes para adesão e colonização de tecidos do hospedeiro, produção de proteases e toxinas que inibem a fagocitose, interferindo na capacidade do hospedeiro de impedir ativamente a infecção através de uma resposta imune específica (KUMAR et al., 2009, OOGAI et al., 2011).

Entre os genes reguladores de virulência encontram-se envolvidos os genes *sea*, *hla* e *icaA*. Os produtos dos genes do tipo *SEA* são os principais relacionados com intoxicação alimentar e responsáveis pelo aumento do peristaltismo intestinal, e já foram identificados em isolados de amostras de humanos, bovinos e produtos de laticínios (JOLHER; SIHTO; MACORI; STEPHAN, 2016). O gene *hla*, é responsável pela produção da alfa toxina, que tem capacidade de formar poros na membrana celular devido às atividades citolítica e hemolítica. A alfa toxina é ativa frente a eritrócitos, monócitos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e queratinócitos. Além disso, a alfa toxina, em combinação com a cápsula bacteriana, impedem que anticorpos interajam com células fagocitárias, conferindo proteção contra a fagocitose (OHLSEN; KOLLER; HACKER, 1997, EL-SAYED; EL-BAGOURY; DAWOUD, 2015). A alfa toxina é secretada como um monômero solúvel em água e sofre uma série de mudanças conformacionais gerando uma estrutura em forma de heptâmero (β -barrel) na membrana do hospedeiro (HASSUNY, 2014).

O gene *icaA* está associado à formação de biofilmes e é responsável pela biossíntese de moléculas de adesão intercelular de polissacarídeos (AIP). Estas moléculas, chamadas de adesinas, são proteínas que se ligam ao colágeno, à fibronectina e ao fibrinogênio. Essas moléculas ficam ancoradas no peptidoglicano contendo N-acetilglucosamina, que é o principal constituinte da matriz quando há formação de biofilmes. Diferentes estudos demonstraram que o gene *icaA* é um fator decisivo para o estabelecimento de infecções estafilocócicas (NAMVAR et al., 2013, MOTTOLA et al., 2016, PRADO et al., 2016, LIU et al., 2017).

Os fatores de virulência de *S. aureus* são regulados de forma coordenada durante o ciclo de crescimento bacteriano, sendo possível avaliá-los por meio de ensaios *in vitro* (POHLMANN-DIETZE, 2000; EDWARDS et al., 2010).

Culturas de células eucarióticas como modelo de patogenicidade bacteriana

Os principais métodos para o estudo da patogenicidade bacteriana são baseados em modelos biológicos animais e vegetais (*in vivo*) e em culturas celulares (*in vitro*) (EDWARDS; MASSEY; 2011). Algumas das linhagens de células eucarióticas mais utilizadas para o estudo de patogenicidade bacteriana são: (i) Caco-2, epitelial humana de adenocarcinoma de cólon (KNUDSEN; HOLCH; GRAM, 2012); (ii) HCT-15, epitelial humana de adenocarcinoma colorretal; (iii) HEp-2, epitelial humana de carcinoma de laringe (EDWARDS; MASSEY; 2011, BARTFELD, 2015), entre outras. Diferentes métodos *in vitro* são recomendados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos para avaliar permeabilidade de células epiteliais a diferentes substâncias e, células das linhagens Caco-2 e Hep-2 são as mais utilizadas como modelos de permeabilidade intestinal, em testes imunológicos e em ensaios de adesão e invasão (AWORTWE, FASINU, ROSENKRANZ, 2014, KOUIDHI et al., 2010).

Estudos de patogenicidade bacteriana utilizando linhagens aderentes de células eucarióticas, em comparação com modelos *in vivo*, oferecem como vantagens a simplicidade e a reprodutibilidade. Embora as interações entre células eucarióticas-patógenos não sejam exatamente idênticas nos cultivos celulares em comparação com condições *in vivo*, há fortes correlações entre a capacidade de adesão e de invasão bacterianas observadas *in vitro* para muitos patógenos de importância em alimentos (LAPARRA; SANZ, 2009, LEA, 2015).

Justificativa

S. aureus tem sido encontrado em indústrias de processamento de alimentos em diversos países, com ocorrência em superfícies, ambientes, matérias primas e produtos prontos para o consumo, como os queijos artesanais (FERREIRA et al., 2011; FISCHER; SCHILTER, 2016; SANTOS et al., 2015). O queijo Minas é bastante consumido pela população brasileira, mas, dependendo das matérias primas utilizadas e das condições de processamento, pode apresentar uma alta taxa de contaminação por *S. aureus* produtores de enterotoxinas. A maioria dos estudos realizados até agora mostram individualmente a patogenicidade e a virulência das cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos. Porém, considerando que este patógeno também se desenvolve em diferentes condições ambientais e nutricionais junto a uma microbiota acompanhante, possivelmente estas espécies microbianas interagem, podendo alterar sua virulência e resistência.

Diante deste cenário, no presente trabalho foi avaliada a capacidade de adesão e invasão de um isolado de *S. aureus* de queijo Minas (do complexo clonal 1 - CC1) em células eucarióticas aderentes das linhagens Hep-2 (adenocarcinoma de laringe) e Caco-2 (carcinoma de cólon). Foram avaliadas possíveis diferenças na capacidade de adesão ou invasão por *S. aureus* testado em co-cultura com microbiota acompanhante e também, a expressão diferencial dos genes *hla*, *icaA* e *sea* em diferentes condições de cultivo.

Objetivos

Objetivo geral

Estudar a virulência de *Staphylococcus aureus* isolado de queijo tipo Minas e sua capacidade de adesão e invasão em células eucarióticas.

Objetivos específicos

- Identificar por métodos moleculares, *Staphylococcus aureus* e sua microbiota acompanhante, previamente isolados e identificados presuntivamente a partir de amostras de queijo tipo Minas.
- Avaliar a virulência de isolados selecionados *S. aureus* por meio de testes de adesão e invasão a células eucarióticas das linhagens Hep-2 e Caco-2, complementando com observações por microscopia confocal a laser.
- Avaliar a capacidade de invasão e adesão de *S. aureus* quando colocado em co-cultura com microbiota acompanhante.
- Avaliar a expressão relativa de genes de virulência de *S. aureus* (*hla*, *icaA* e *sea*) em diferentes condições de cultivo, por meio de PCR em tempo real.

Conclusões

- Foram identificados *S. aureus* e dez bactérias como microbiota acompanhante na amostra de queijo Minas. Nove das bactérias acompanhantes do patógeno tinham sido reportadas previamente em amostras de produtos de laticínios exceto *S. nematodophila*.
 - *L. lactis* MC5 e *L. mesenteroides* MC5 mostraram atividade inibitória frente a *S. aureus* sendo que *L. lactis* MC5 mostrou atividade inibitória de substâncias de natureza proteica.
 - *S. aureus* isolado de queijo Minas mostrou uma capacidade estatisticamente diferente de adesão e invasão quando foram testados nas células de diferentes origens Hep-2 (adenocarcinoma de laringe) e Caco-2 (carcinoma de cólon).
 - A redução da capacidade de adesão em células Hep-2 e Caco-2 de *S. aureus* testado em co-cultura com *L. lactis* está diretamente ligada com a competição bacteriana, pois quando foi testado o SLC, não houve diferença significativa na capacidade de adesão.
 - A capacidade de adesão de *S. aureus* em células Hep-2 e Caco-2 aumentou em co-cultura com *L. mesenteroides* MC5, possivelmente por algum tipo de sinergismo entre *S. aureus* e *L. mesenteroides* MC5 que favoreceu a adesão do patógeno na célula hospedeira.
 - *S. aureus* apresentou menor expressão relativa dos genes *hla* (α -toxina) e *icaA* (adesina intercelular) quando testado nos meios BHI+G e BHI+G+N, comparados com o controle BHI, indicando que a glicose e o cloreto de sódio inibem a expressão desses genes.
 - A expressão relativa do gene *sea* foi maior quando o cultivo de *S. aureus* foi feito em queijo Minas (leite, cloreto de sódio 4% e cloreto de cálcio 0,06%), comparada com a expressão relativa em leite pasteurizado e leite em pó.
-

REFERÊNCIAS

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, L.; BORGES, A.; KIPNIS, F.; PIMENTA, A.; SERAFINI, B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following small digestion. **Food Control**, v. 19, p. 200-207, 2008.

ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p. 61-66, 2010.

ALZBETA, M.; LUBOMIR, V. *Staphylococcus aureus*: characterization and quantitative growth description in milk and artisanal raw milk cheese production. In: _____. **Structure and function of food engineering**. Bratislava: InTech, 2012. p. 71-102.

ALZBETA, M.; LUBOMÍR, V.; STUDENICOVÁ, A. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. 2-28, 2009.

ARGUDÍN, M.; MENDOZA, M.; RODICIO, M. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara region of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 99-106, 2011.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb drug interaction studies: Current approaches and challenges. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. v. 17. p. 1-19. 2014.

BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.; HJELM, M.; CHRISTIANSEN, C.; GRAM, L. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries – analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 239-250, 2003.

BARGAL, G.; KAHILA-BLUM, S. E.; HADAS, L.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; LEITNER, G. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v. 176, p. 143-154, 2015.

BARTFELD, S.; BAYRAM, T.; WETERING, M.; HUCH, M.; BEGHTEL, H.; KUJALA, P.; VRIES, R.; PETERS, P.; CLEVERS, H. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. **Gastroenterology**, v. 148, p.126–136, 2015.

BENMECHERNENE, Z.; FERNÁNDEZ, I.; QUINTELA-BALUJA, M.; BÖHME, K.; CALO-MATA, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, P. Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from raw camel milk in two Southwest Algerian arid zones. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-15, 2014.

BERMUDEZ-BRIO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, G.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.; ROMERO, F.; GIL, A. Cell-free culture supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. **PLoS One**, v. 8, p. 3-8, 2013.

BOUMLIL, W.; BENCHIKHI, H.; ZEGGWAGH, A.; BELABBES, H.; MDAGHRI, N. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in community-acquired skin infections. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 46, n. 6, p. 269-342, 2016.

COTON, M.; DELBÉS-PAUS, C.; IRLINGER, F.; DESMASURES, N.; LE FLECHE, A. STAHL, S MONTEL, M. C.; COTON, E. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. **Food Microbiology**, v. 29, p. 88–98, 2012.

CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, M.; LUZZANA, M. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 586–591, 2007.

DABUL, A.; CAMARGO, I. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: All mixed and together. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 7-8, 2014.

DA SILVA, C. G.; BONDAN, C.; NETO, A. T.; MACHADO, K. M.; GONZALEZ, F. H. D. Composição do leite: estado atual do percentual de sólidos no Rio Grande do Sul. **Revista de Veterinaria e Zootecnia**, v. 20, p. 257-259, 2013.

DAVIDSON, P. M.; TAYLOR, T. M.; SCHMIDT, S. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. **Food Microbiology**, v. 1, p. 765-801, 2013.

DE MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 32-37, 2001.

EBBENSGAARD, A.; MORDHORST, H.; OVERGAARD, M.; NIELSEN, CG.; AARESTRUP, F.; HANSEN, E. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. **PLoS One**, v. 10, p. 10- 24, 2015.

EDWARDS, A. M.; POTTS, J. R.; JOSEFSSON, E.; MASSEY R. C. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. **PLoS One Pathogens**, v. 6, p. 1-6, 2010.

EDWARDS, A. M.; MASSEY, R. C. Invasion of human cells by a bacterial pathogen. **Journal of Visualized Experiments**, v. 49, p. 2693, 2011.

ELEAUME, H; JABBOURI, S. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 363-370, 2004.

ELSAYED, M.; EL-BAGOURY, A.; DAWOUD M. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. **Veterinary World**, v. 8, p. 223-232, 2015.

FALLICO, V.; MCAULIFFE, O.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Plasmids of raw milk cheese isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DPC3901 suggest a plant-based origin for the strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 6451–6462, 2011.

FERREIRA, R.; SPINI, J.; CARRAZZA, L.; SANTANA, D.; OLIVEIRA, M.; ALVES, A. Search by coagulase positive *Staphylococcus* in artisan Minas cheese. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5. p. 10-21, 2011.

FERREIRA, M.; BERNARDO, L.; NEVES, S.; CAMPOS, M.; LAMARO-CARDOSO, J.; ANDRÉ C. P. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 8590-8597, 2016.

FISCHER, W. J.; SCHILTER, B. Contaminants of milk dairy products: Contamination resulting from farm and dairy practices. **Reference Module in Food Science**, v. 1, p. 1-13, 2016.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K.; HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 49-62, 2014.

FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. L. Manual técnico para a produção industrial de queijos. In: _____. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipermar, 1994. p. 1-118.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. DE M.; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens**, v. 10, p. 197–205, 2013.

HASSUNY, A. Detection of Virulence Factors *hla* and *hlb* of *Staphylococcus aureus* using PCR Technique. **Medical Journal of Babylon**, v. 11, p. 4-10, 2014.

HOSSEIN, J.; MOHAMADJAVAD, P.; BEHRAD, R.; SALMAH, I.; AREZOO, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.

IKEDA, T.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real time PCR. **Journal of Veterinay Medical Science**, v. 67, p. 1037-1041, 2005.

JOHLER, S.; SIHTO, H.; MACORI, G.; STEPHAN, R. Sequence variability in staphylococcal enterotoxin genes *seb*, *sea*, and *sed*. **Toxins**, v. 8, p. 169-175, 2016.

KHEMARIYA, P.; SINGH, S.; NATH, G.; GULATI, A. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of *nis*⁺ *Lactococcus lactis* from dairy and non-dairy sources. **Czech Journal of Food Science**, v. 31, p. 323–331, 2013.

KHORAMIAN, B.; JABALAMELI, J.; NIASARI-NASLAJI, A.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among

Staphylococcus aureus strains isolated from human and bovine infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 73-77, 2015.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, p. 14-22, 2010.

KNUDSEN, G. M.; HOLCH, A.; GRAM, L. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect stress and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* and cause enhanced stress sensitivity but do not affect Caco-2 cell invasion. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1273–1286, 2012.

KUMAR, G.; NEGI, Y.; GAUR, A.; KHANNA, D. Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. **International Journal Infectious Diseases**, v. 3, p. 450-455, 2009.

LAPARRA, J.; SANZ, J. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 6, p. 695-701, 2009.

LEA, T. Caco-2 cell line. **The Impact of Food Bioactives on Health**, v. 1, p. 103-111, 2015.

LEISNER, J. J.; LAURSEN, B. G.; PRÉVOST, H.; DRIDER, D.; DALGAARD, P. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 592–613, 2007.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3622-3632, 2015.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 145- 150, 1991.

LI, L.; SHIN, S.; LEE, K.; HAN, N. Production of natural antimicrobial compound D-phenyllactic acid using *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 whole cells involving highly active d-lactate dehydrogenase. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, p. 404-411, 2014.

LIU, M.; WU, X.; LIU, L.; ZHANG, R.; SHAO, S.; DU, G. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. **Food Control**, v. 73, p. 613–618, 2017.

LOWY, F. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265–1273, 2003.

MAIDEN, M.; BYGRAVES, J.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.; FEAVERS, I.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. In:_____. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1972. p. 315–342.

MÉNDEZ, M. B.; GOÑI, A.; RAMIREZ, W.; GRAU, R. Sugar inhibits the production of the toxins that trigger clostridial gas gangrene. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, p. 85-91, 2012.

MERGHNI, A.; NEJMA, B. M.; HELALI, I.; HENTATI, H.; BONGIOVANNI, A; LAFONT, F.; AOUNI, M.; MASTOURI.M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 86, p. 1-9, 2015.

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

MENEZES, M.; DUTRA, E. Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 524–531, 2017.

MIAO, J.; CHEN, L.; WANG, J.; WANG, W.; CHEN, D.; LI, L.; LI, B.; YANG, X. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 17-28, 2017.

MINAS GERAIS. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Lei estadual nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2012.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A.; COLEMAN, D.; AKPAKA, P.; BORG, M.; CHOW, H.; JATZWAUK, L.; JONAS, D.; KADLEC, K.; KEARNS, A.; LAURENT, F.; O'BRIEN, F.; PEARSON, J.; RUPPELT, A.; SCHWARZ, S.; SCICLUNA, E.; SLICKERS, P.; TAN, H.; WEBER, S.; EHRLICH, R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 6, p. 1-24, 2011.

MORAES, P.; VIÇOSA, G.; YAMAZI, A.; ORTOLANI, M.; NERO, L. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 245–249, 2009.

MORONI, O.; KHEADR, E.; BOUTIN, Y.; LACROIX, C.; FLISS, I. Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-

producing *Bifidobacterium* strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 6894–6901, 2006.

MOTTOLA, C.; SEMEDO-LEMSADDEK, T.; MENDES, J.; MELO-CRISTINO, J.; TAVARES, L.; CAVACO-SILVA, P.; OLIVEIRA, M. Molecular typing, virulence traits and antimicrobial resistance of diabetic foot staphylococci. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, p.33-38, 2016.

NAMVAR, A.; ASGHARI, B.; EZZATIFAR, F.; AZIZI, G.; RASTEGAR, A. Detection of intercelullar adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **GMS Higyene Infection Control**, v. 8, p. 1-5, 2013.

OHLSSEN, K.; KOLLER, R.; HACKER, G. Analysis of Expression of the alpha-toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla:lacZ* gene fusion. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3606–3614, 1997.

OOGAI, Y.; MATSUO, M.; HASHIMOTO, M.; KATO, F.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p.8097–8105, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, p. 32-37, 2014.

PEARCE, L. E.; SMYTHE, B. W.; CRAWFORD, R. A.; OAKLEY, E.; HATHAWAY, S. C.; SHEPHERD, J. M. Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 20-35, 2012.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 2-13, 2014.

PINCHUK, I.; BESWICK, E.; REYES, V. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v.

2, p. 2177-2197, 2010.

PING, J.; ABERCROMBIE, N.; JEFFREY, K. LEUNG, P. An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, p. 115-118, 2012.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cells**, v. 124, p. 715- 727, 2006.

PLANET, P.; NARECHANIA, A.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; BOUNDY, S.; ARCHER, G.; KREISWIRTH, B. Architecture of a species: phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 153-166, 2017.

POHLMANN-DIETZE, P.; ULRICH, M.; KISER, K.; DORING, G.; LEE, J.; FOURNIER, J.; BOTZENHART, K.; WOLZ, C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4865–4871, 2000.

PRADO, J.; OLIVEIRA, E. S. G.; RODRIGUES, D. F. C.; BAPTISTA, C.; SOUZA, C.; LIMA, D.; PORTO, P. Efficiency of a cleaning protocol for the removal of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in dairy plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 295-301, 2016.

RABELLO, R.; MOREIRA, B.; LOPES, R.; TEIXEIRA, L.; RILEY, L.; CASTRO, A. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1505-1511, 2007.

RASHID, F.; SHARIF, N.; ALI, I.; NAZ, S.; SHARIF, S.; NISA, F. Antimicrobial potential of *Lactococcus lactis* bacteriocin against *Salmonella typhi*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 436-439, 2013.

RATTI, R. P.; SOUZA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 137-143, 2009.

RODRIGUES, J.; FIDELIS, F.; BARBOSA, F.; GARCIA, T.; ISSY, P.; ARMONDES, M. Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo tipo Minas frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-GO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, p. 30–34, 2011.

SAADAT, I.; FOOLADI, R.; SHAPOURI, M.; HOSSEINI, M.; KHIABANI, O. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*, in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 6, p. 345–349, 2014.

SALES, L. M.; DA SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, p. 1-13, 2012.

SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, J. S.; ROCHA, C. R. C.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M.; FRANCO, B. D. G. M; TODOROV, S. D. Safety beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237-249, 2015.

SCHAFFNER, F.; RAY, A.; DONTENWILL, M. Integrin $\alpha 5\beta 1$, the fibronectin receptor, as a pertinent therapeutic target in solid tumors. **Cancers**, v. 5, p. 27-47, 2013.

SMITH, J.; BENCIVENGO, M.; BUCHANAN, R.; KUNSCH, C. Enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*: inhibition by glucose. **Archives of Microbiology**, v.144, p.131-136, 1986.

SNEL, G. M. M.; MALVISI, M.; PILLA, R.; PICCININI, R. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 174, p. 489-495, 2014.

SON, H.; PARK, S.; BEUCHAT, L.; KIM, H.; RYU, J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by antimicrobial biofilms formed by competitive exclusion microorganisms on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v.238, p.165-171, 2016.

TEXEIRA, F. Queijo Minas Frescal. In: _____ **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria**. Embrapa. Brasília. 2005. p. 13-30.

THAPALIYA, D.; FORSHEY, B.; KADARIYA, J.; QUICK, M.; FARINA, S.; O'BRIEN, A.; NAIR, R.; NWORIE, A.; HANSON, B.; KATES, A.; WARDYN, S.; SMITH T. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa. **Food Microbiology**, v. 65, p. 122-129, 2017.

TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 603-310, 2015.

YANG, C.; HUNG, L.; SUNG, C.; FANG, J. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 5-22, 2014.

YANG, J.; JI, Y. Investigation of *Staphylococcus aureus* adhesion and invasion of host cells. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods in Molecular Biology**, v. 1085, p. 187-194, 2013.

WASKO, A.; POLAK-BERECKA, M.; TARGONSKI, Z. A new protein of α -amylase activity from *Lactococcus lactis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1307-1313, 2010.

WIDYASTUTI, Y.; FEBRISANTOSA, A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 435-442, 2014.

WINKELSTRÖTER, L.K.; DE MARTINS E.C.P. *In vitro* protective effect of lactic acid bacteria on *Listeria monocytogenes* adhesion and invasion of Caco-2 cells. **Beneficial Microbes**, v. 6, p. 535- 542, 2015.