

Ana Luiza Coutinho Favilla

**DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM TOXINAS, LEUCOCIDINA DE PANTON-
VALENTINE E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Staphylococcus aureus* E
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESVAL**

Rio de Janeiro

2017

Ana Luiza Coutinho Favilla

**DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM TOXINAS, LEUCOCIDINA DE PANTON-
VALENTINE E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Staphylococcus aureus* E
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESVAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Victor Augustus Marin
Co-orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Favilla, Ana Luiza Coutinho

Deteção de genes que codificam toxinas, leucocidina de panton-valentine e resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* e *Estafilococos* coagulase negativa isolados de queijo minas frescal / Ana Luiza Coutinho Favilla. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

117 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz 2017.

Orientadoras: Victor Augustus Marin, Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Queijo. 2. Contaminação de Alimentos. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Enterotoxinas. 5. Controle de Qualidade I. Título.

Detection of genes encoding toxins, panton-valentine leucocidin and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from Minas frescal cheese

Ana Luiza Coutinho Favilla

**DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM TOXINAS, LEUCOCIDINA DE PANTON-
VALENTINE E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Staphylococcus aureus* E
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Verônica Viana Vieira (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Aline Mello (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Luciana Golinelli (Doutor)
Universidade Salgado de Oliveira

Victor Augustus Marin (Doutor) - Orientador
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Victor Marin, pelos conhecimentos repassados e pela oportunidade de experiência com a ciência.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Shirley Abrantes, por todas as orientações acolhedoras e fundamentais durante todo o processo.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

À equipe e amigos do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aos meus pais Sueli Coutinho e Alexandre Chagas por todo o amor e incentivo aos estudos.

Aos meus irmãos, Alexandre e Flávio Favilla pela paciência

A minha tia Gleici Favilla e meu primo Wander Favilla que, mais do que ninguém, me fizeram ver que o caminho, embora longo, ele vale muito a pena.

Ao meu noivo, Marcos Botelho, parceiro, cúmplice e incentivador número um.

A minha amiga-irmã, Nathalia Amarante por acreditar, confiar e estar sempre ao lado, disponível em qualquer situação.

As minhas amigas de faculdade Camila Didini, Julia Quarti, Maria Luiza Bastos e Daniela Mucci pelo exemplo e apoio dados.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro por apresentar-me a vida acadêmica.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte”.

Albert Einstein

RESUMO

Staphylococcus spp. tem grande importância clínica e em alimentos. Os últimos levantamentos de órgãos oficiais mostram o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) como um dos principais agentes etiológicos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), devido a sua capacidade de produzir toxinas. De modo correlato, diversas espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN) têm emergido como enterotoxigênicas em isolados de alimentos, e não somente como bactérias oportunistas de isolados clínicos. Os laticínios, dentre eles os queijos, estão entre os alimentos mais comumente associados a surtos de DTA. Sendo o queijo Minas frescal um alimento tipicamente brasileiro e de características favoráveis à proliferação de microrganismos, o presente estudo teve como objetivo a detecção de genes que codificam enterotoxinas clássicas (EE), toxinas esfoliativas (TE), toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), leucocidina de panton-valentine (PVL) e resistência a antibióticos em *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa (ECN) isolados de queijo Minas frescal. Foram coletadas 10 amostras comercializadas no Rio de Janeiro no período de fevereiro a abril de 2016. Foi feita a semeadura em ágar Baird Parker suplementado com plasma fibrinogênio de coelho (BPA-RPF) e ágar manitol salgado (MSA) e os isolados foram caracterizados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na contagem em placa em BPA-RPF, somente uma amostra estava fora dos critérios microbiológicos para estafilococos coagulase positiva, estipulados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Enquanto em MSA, 40% das amostras estão inadequadas. Em 10 amostras, foram isolados 140 ECN e 32 *S. aureus*. Os resultados mostraram que 27,9% (48/172) dos isolados de *Staphylococcus spp.* carregavam pelo menos um gene de produção de EE ou TE. O gene mais prevalente foi o da TEA - *eta* (39,3%), seguido do *sed* (26,2%). Nenhum isolado carregou o gene para resistência a meticilina, *mecA*, ou TSST ou PVL. Independente da capacidade de produção da toxina, medidas de controle são necessárias, como a manutenção da cadeia de frio e boas práticas de higiene para evitar a disseminação e proliferação desses isolados. Palavras-chave: queijo; estafilococos coagulase negativa; toxina esfoliativa; enterotoxinas; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Staphylococcus sp. has a worldwide clinical and food impact and recent official publications show *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) as a major pathogen of Foodborne Diseases (FBD) due to its ability to produce toxins. Besides, coagulase negative staphylococci (CoNS) emerged as enterotoxigenic in food isolates, and not just as opportunistic bacteria from clinical isolates. In addition, dairy products have been associated frequently with FBD and Minas frescal is a typical Brazilian cheese with favorable conditions for proliferation of microorganisms. The aim of this study was to detect staphylococcal enterotoxins (SE), exfoliative toxins (ET), toxic shock syndrome toxin (TSST), leucocidin of panton-valentine (PVL) and resistance to methicillin genes in *S. aureus* and CoNS isolated from Minas frescal cheese. Ten samples marketed in Rio de Janeiro were collected from February to April of 2016. Enumeration was carried out by plating on Baird Parker agar with rabbit fibrinogen plasma supplement (BPA-RPF) and mannitol salt agar (MSA). The isolates were characterized by Polymerase Chain Reaction (PCR). In the plate count in BPA-RPF, only one sample had contamination levels above the standard set by RDC n.12 for the coagulase positive staphylococci. While in MSA, 40% of the samples were in the same conditions. On 140 CoNS and 32 *S. aureus* isolated, 27.9% (48/172) carried at least one gene for ET or SE. The most prevalent gene was eta (39.3%), followed by sed (26.2%). Genes *mecA*, *tsst* or *pvl* were not detected. Despite the ability for toxin production, preventative measures, such as maintenance of the cold-chain and good hygienic practices should be implemented to prevent the spread of pathogenic strains. Keywords: cheese; coagulase-negative staphylococci; exfoliative toxin; enterotoxin; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sistema Agr.....	26
Gráfico 1 – Gráfico da contagem em placa em BPA-RPF de ECN e ECP <i>S. aureus</i> por amostra de queijo.	61
Gráfico 2 - Gráfico da contagem em placa em MSA de ECN e ECP <i>S. aureus</i> por amostra de queijo	62
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para amplificação do gene <i>tstag442</i> (370 bp)	64
Gráfico 3- Proporção de isolados ECN provenientes dos meios MSA e BPA-RPF em relação ao número total de colônias selecionadas (n=266)	65
Gráfico 4 - Proporção de isolados <i>S. aureus</i> provenientes dos meios MSA e BPA-RPF em relação ao número total de colônias selecionadas (n=266)	65
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para amplificação dos genes <i>cns</i> (204bp) e <i>spa</i> (101bp)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais espécies de estafilococos de isolados clínicos e suas patologias associadas	19
Tabela 2	Testes bioquímicos para identificação da espécie <i>S. aureus</i>	22
Tabela 3	Resistência antimicrobiana	37
Tabela 4	Microrganismos de referências, fonte fornecedora, depósito proveniente e característica genética	51/52
Tabela 5	Sequência de nucleotídeos, tamanho dos amplicon e referências	56
Tabela 6	Número de queijos, estado produtor, data e supermercado da coleta	59
Tabela 7	Colônias repicadas a partir de BPA-RPF e MSA	60
Tabela 8	Classificação das amostras segundo a contagem de ECP de acordo com a RDC nº12 (BRASIL, 2001)	63
Tabela 9	Colônias isoladas a partir de cada meio de cultura	64
Tabela 10	Distribuição de isolados <i>S. aureus</i> e ECN por amostra	67
Tabela 11	Genes de virulência amplificados por amostra e por meio de cultura (PARTE I e III).	68/69
Tabela 12	Padrão de genótipos em <i>Staphylococcus spp.</i> Isolados de queijo Minas frescal (n=172)	71

LISTA DE SIGLAS

AIP	Peptídeo autoindutor
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
APPCC	Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aw	Atividade de água
BAM	<i>Bacteriological Analytical Manual</i>
BPA-RPF	Ágar Baird Parker suplementado com fibrinogênio e plasma de coelho
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido na comunidade
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ECN	Estafilococos coagulase negativa
ECP	Estafilococos coagulase positiva
EE	Enterotoxina estafilocócica
EE-like	Semelhante a Enterotoxina estafilocócica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido em hospital
HACCP	<i>Hazard Analysis Critical Control Points</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
IN	Instrução Normativa
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LCR	Laboratório de Referência do Comitê Europeu
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC	Complexo de histocompatibilidade

LISTA DE SIGLAS

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MS	Ministério da Saúde
MSA	Ágar Manitol Salgado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	Polimorfonuclear
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
PVC	Policloreto de vinila
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
RNA	Ácido ribonucleico
RPF	Fibrinogênio e plasma de coelho
SA	Superantígeno
SSSS	Síndrome da pele escaldada
TE	Toxina esfoliativa
TNase	Termonuclease
TSST	Toxina da síndrome do Choque Tóxico
VISA	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTO (DTA): PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL	16
1.2 <i>Staphylococcus spp.</i> : INTRODUÇÃO SOBRE O GÊNERO DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EM ALIMENTOS.	17
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.4 ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA (ECN): DE CONTAMINANTE A PATÓGENO	23
1.5 PATOGÊNESE: MECANISMOS E FATORES DE VIRULÊNCIA.	24
1.5.1 Superantígenos (SA)	26
1.5.1.1 <i>Enterotoxinas estafilocócicas (EE)</i>	27
1.5.1.2 <i>Toxinas Esfoliativas (TE)</i>	30
1.5.1.3 <i>Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST)</i>	31
1.5.2 Citotoxinas	32
1.5.2.1 <i>Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)</i>	32
1.6 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: EM ISOLADOS CLÍNICOS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL.	33
1.6.1 Cepas multirresistentes: é possível controlá-las?	33
1.6.2 Resistência a antibióticos em estafilococos	34
1.7 CONSUMO DE PRODUTOS LÁCTEOS E A PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL	39
1.8 MÉTODOS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS	41
1.9 LEGISLAÇÃO: REGULAÇÃO NA PRODUÇÃO E CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS	44
1.10 JUSTIFICATIVA.....	47

2. OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO	49
GERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
3. METODOLOGIA	50
3.1 AMOSTRAGEM	50
3.2 MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA E RECONSTITUIÇÃO DAS AMPOLAS	51
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	52
3.4 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE ESTAFILOCOCOS DE ACORDO COM APHA E FDA (BENNETT; HAIT; TALLENT, 2015; BENNETT; LANCETTE, 1998)	53
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	54
3.6 RECONSTITUIÇÃO DE PRIMERS	55
3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	55
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	58
4. RESULTADOS	59
4.1 AMOSTRAGEM E CARACTERÍSTICAS	59
4.2 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS EM BPA-RPF E MSA E CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A RDC nº 12 (BRASIL, 2001)	59
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS	63
4.4 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA	66
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXO A – FIGURA DA SINTOMATOLOGIA DA SÍNDROME DA PELE ESCALDADA, CAUSADA PELA TOXINA EXFOLIATIVA PRODUZIDA POR <i>S. aureus</i>	107

ANEXO B – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL.	108
ANEXO C (PARTES I, II, III e IV) – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES.	109/112
APÊNDICE A – FOTOGRAFIA DE AMOSTRA DE QUEIJO APÓS PROCESSO DE MACERAÇÃO.	113
APÊNDICE B - FOTOGRAFIA DE SUJIDADE EVIDENTE DENTRO DA EMBALAGEM DA AMOSTRA Q3 LACRADA.	114
APÊNDICE C - PLACA DE PETRI COM BPA-RPF COM FORMAÇÃO DE MASSA SÓLIDA.	115
APÊNDICE D – PLACAS DE MSA COM CRESCIMENTO DE COLÔNIAS FERMENTADORAS (AMARELAS) E NÃO-FERMENTADORAS DE MANITOL (AVERMELHADAS).	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTO (DTA): PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL

“Doença transmitida por alimento” pode ser definida por agravo originado pela ingestão de alimento contaminado. Contaminação esta, que pode ser proveniente de microrganismos, parasitas, contaminantes químicos ou biotoxinas (WHO, 2013). Manifesta-se desde formas mais brandas até sintomatologias mais severas, que podem carecer de cuidados hospitalares ou mesmo causar a morte (MARCHI et al, 2011). Surtos de DTA são definidos pela ocorrência de dois ou mais casos de uma doença, com o mesmo quadro clínico, devido a ingestão de um alimento ou água contaminados em comum (SANTANA, E. et al, 2010). Dados do Ministério da Saúde (MS) mostram que de 2007 a 2016, 469.482 pessoas foram consideradas indivíduos expostos, isto é, aqueles dos quais poderiam ter entrado em contato com a contaminação ou ingeriram o alimento contaminado, mas por algum motivo não desenvolveram a doença. Embora a taxa de letalidade não ultrapasse 0,09%, foram notificados 6.632 surtos com 118.104 de doentes, neste mesmo período (BRASIL, 2016).

A OMS estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adoeça devido a surto de DTA e somente uma pequena proporção destes casos é notificada. No Brasil, essa notificação é feita pelas Secretarias Estaduais de Saúde e Secretarias Municipais de Saúde ao Ministério da Saúde através de formulários padronizados ou pela internet através do Sistema Nacional de Agravos e Notificações (BRASIL, 2016).

Segundo o Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (E.U.A., 2011), nos Estados Unidos, de 38,6 milhões de casos de doenças gastrointestinais causadas por patógenos identificados, 36% deste total são atribuídos as DTA. Surtos de DTA têm causado consequências econômicas tanto em países desenvolvidos, como em países emergentes (WHO, 2013).

Todo ano a OMS seleciona uma área de prioridade na saúde pública para ser tema do Dia Mundial da Saúde. Com o *slogan* "From farm to plate, make food safe"

1 o tema do ano de 2015 foi "Segurança Alimentar", que a instituição descreve como um assunto de alta relevância para vários setores, incluindo os governamental, civil, privado e agências intergovernamentais (WHO, 2015).

O papel da Vigilância Sanitária no Brasil nesse contexto é de fiscalizar, controlar e fornecer subsídios regulatórios para uma adequação do processo produtivo de alimentos desde a matéria prima até o produto final (ALMEIDA et al, 2013).

1.2 *Staphylococcus spp.*: INTRODUÇÃO SOBRE O GÊNERO DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EM ALIMENTOS.

O gênero *Staphylococcus* sp. pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli ou Firmibacteria, da ordem Bacillales da família Staphylococcaceae. Apresenta 51 espécies, 28 subespécies, sendo somente 15 espécies encontradas em humanos (EUZÉBY, 2017)

Os estafilococos são mesófilos, com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8° C. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3. Possuem capacidade de se multiplicarem em alimentos com valores de atividade de água (aw) inferiores ao normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de aw é 0,86 (SANTANA, E. et al, 2010; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

São considerados ubiqüitários uma vez que são encontrados na microbiota da pele e mucosas do homem e de outros animais. São cocos Gram-positivos, podendo se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados. São imóveis, anaeróbios facultativos, halotolerantes, mesófilos, não formadores de esporos e produtores de catalase. Podem apresentar cápsula polissacarídica ou camada mucóide e a parede celular pode conter ácido ribitol teicóico (polissacarídeo A), como em *S. aureus* ou ácido glicerol teicóico (polissacarídeo B), como em *Staphylococcus epidermidis* (MADIGAN et al, 2010). Muitas espécies são isoladas de partes específicas do corpo humano ou de certos animais, como por exemplo *S. auricularis* isolado do trato auditivo humano e o *S. hyicus* causador de dermatite infecciosa em suínos.

¹ Tradução nossa: "da fazenda ao consumidor final, faça o alimento seguro".

Baseado na necessidade de diferenciação entre a espécie mais patogênica em isolados clínicos e as demais espécies, historicamente menos ou não patogênicas, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa, ECP e ECN, respectivamente (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). No grupo ECP tem-se o *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, alguns isolados de *S. hyicus* e o *S. aureus*, o mais virulento e importante do grupo. No grupo ECN, está a maior parte das espécies do gênero, como por exemplo, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. xylosum*, entre outros (LUZ, 2008). Essa divisão é feita de acordo com a resposta ao teste da coagulase. Essa enzima, embora não seja exclusiva do gênero, atua de maneira muito importante no meio extracelular. Ela coagula o plasma sanguíneo transformando o fibrinogênio em fibrina (BRASIL, 2013).

Das seis espécies reconhecidas que hoje compõem o grupo dos ECP, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de surtos de DTA (BRANDÃO et al, 2013). Com isso, essa enzima ainda é utilizada em muitos estudos e materiais de referência como característica de identificação da espécie *S. aureus* (BRASIL, 2001; UNIÃO EUROPEIA, 2005).

As espécies que mais colonizam e causam doenças em humanos são *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* e *S. lugundensis* (BRASIL, 2013).

No geral, os estafilococos causam doença através da invasão direta, proliferação celular e destruição tecidual, mas também podem instalar a patologia através da produção de toxinas (Tabela 1) (MADIGAN et al, 2010).

Em rebanhos produtores, o *Staphylococcus* sp. pode causar infecção nas tetas das vacas através da produção de toxinas e destruição da membrana celular, podendo prejudicar diretamente a produção de leite. Algumas vacas desenvolvem mastite clínica após o parto, porém frequentemente a infecção é subclínica, ou seja, leva ao aumento da contagem de células somáticas, mas não há sintomas aparentes no úbere, nem alterações no leite produzido. Com isso, caso não haja a detecção da doença por meio de exames e testes, a infecção pode ser transmitida a outras vacas do rebanho e ao próprio leite sem conhecimento do produtor (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

Tabela 1**Principais espécies de estafilococos de isolados clínicos e suas patologias associadas**

Espécies	Patologias
<i>S. aureus</i>	Mediada por toxina (toxinfecção alimentar, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada – SSSS2 Cutânea em carbúnculos, foliculite, impetigo. Infecções de feridas, bacteremia, endocardite, osteomielite, pneumonia, artrite séptica, etc.
<i>S. epidermidis</i>	Infecções do trato urinário, endocardite feridas cirúrgicas, infecções oportunistas de cateteres e diálise peritoneal. Também pode ser mediada por toxinas.
<i>S. saprophyticus</i>	Infecções do trato urinário e oportunistas.
<i>S. lugundensis</i>	Artrite, bacteremia, endocardite.
<i>S. haemolyticus</i>	Infecções de ossos e articulações e de feridas.
<i>S. intermedius</i> ^a	Infecções teciduais e abscesso cerebral

^a Comensal de cães com raros relatos de infecções em humanos (WANG; NEILAN; KLOMPAS, 2013).

Fonte: Adaptado de Microbiologia de Brock. Madigan et al, 2010.

Chagas e colaboradores (2012) detectaram estafilococos coagulase positiva (ECP) como o agente etiológico mais prevalente em amostras de leite de vacas com mastite subclínica em Minas Gerais, seguido de *Staphylococcus epidermidis*. Outros estudos isolaram espécies de ECN de amostras de leite produzido por vacas mastíticas (COELHO et al., 2009; GUIMARÃES et al, 2013) e também de amostra de queijo minas (FONTES et al, 2013).

No caso da ingestão de alimentos contaminados por *Staphylococcus spp.* a doença pode se manifestar na forma de: infecções, intoxicações ou toxinfecções alimentares. As infecções alimentares são resultantes da ingestão de alimentos que contém microrganismos patogênicos vivos. As intoxicações alimentares ocorrem quando as toxinas estão pré-formadas no alimento ingerido. As toxinfecções alimentares resultam da ingestão de alimentos com certa quantidade de microrganismos capazes de produzir ou liberar toxinas após serem ingeridos (ALMEIDA et al, 2013).

O período de incubação e a sintomatologia variam de acordo com a sensibilidade individual e a quantidade de toxina no alimento ingerido (FRANCO;

² *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*.

LANDGRAF, 2002), podendo ser de 15 minutos a 8 horas, sendo em média 2 a 4 horas. Os principais sintomas são náuseas, vômito, câibras abdominais e diarreia. Quadros febris são incomuns e, quando presentes, normalmente estão associados à ingestão de grandes quantidades de toxina (SANTANA, E. et al, 2010).

1.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus subsp. *aureus* é normalmente chamado apenas de *S. aureus* na literatura, sem acrescentar a subespécie (SILVA, Neusely et al, 2010). Ele é considerado parte da flora humana normal, pois, aproximadamente um terço da população é colonizado por esse organismo sem que tenha nenhuma doença associada (DELEO et al, 2010).

É o principal representante do grupo ECP de importância para alimentos. Segundo Becker e colaboradores (2001), só há uma outra espécie coagulase positiva que já foi associada a surto de DTA; o *S. intermedius* é considerada a espécie não-*S. aureus* coagulase positiva mais predominantemente isolada de alimentos (BECKER et al, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

S. aureus pode crescer em uma grande variedade de temperatura, pH e concentrações de até 15% de NaCl, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de toxinfecções (SANTANA, E. et al 2010). Também pode sobreviver a ambientes secos e estressantes: desde a narina humana até utensílios de cozinha. *S. aureus* pode permanecer viável em superfícies por longos períodos após o contato inicial (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

Além de causar infecções agudas pela produção de toxinas e exo-enzimas, os *S. aureus* também podem causar infecções crônicas associadas ao crescimento em forma de biofilme: uma comunidade bacteriana que cresce aderida a uma superfície e é revestida por uma matriz extracelular polimérica. Essa forma do crescimento caracteriza uma habilidade do patógeno de se aderir e persistir em tecidos, como ossos e artérias, ou até mesmo em materiais implantados como cateteres, marca passos ou próteses. Na produção de alimentos, a formação de biofilme pode ocorrer em equipamentos, utensílios e bancadas. A higienização adequada das superfícies torna-se um ponto crítico para que não haja contaminação dos alimentos (LISTER; HORSWILL, 2014).

S. aureus secretam uma diversidade de enzimas que degradam tecidos,

podendo ser elas lipases, nucleases, hialuronidasas, plasminas e, a principal delas, as coagulases. A enzima coagulase pode ser de duas formas: uma é aderida a superfície das bactérias, com a capacidade de converter fibrinogênio a fibrina; e a outra forma é secretada e combinada ao fator de coagulação no soro, resultando na formação da staphylotrombina, que também dá origem a fibrina insolúvel. Esse fator pode ser considerado antifagocítico (FOX, 2015).

Outra importante enzima é a termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase). Ela é uma fosfodiesterase com propriedades endo e exonucleolítica. Esta enzima pode clivar o DNA ou RNA gerando 3`-fosfomononucleotídios termoestáveis, e é produzida pela maioria das cepas de *S. aureus* (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). O gene *nuc*, que codifica a termonuclease, também é amplamente utilizado como marcador específico de identificação da espécie *S. aureus* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HOEGH et al, 2014). Um estudo feito na Espanha em 2004, avaliou a especificidade dos iniciadores do gene *nuc* para identificação de *S. aureus* como uma alternativa aos procedimentos convencionais para identificação de surto alimentares envolvendo *S. aureus*. Foram usadas 158 cepas de *S. aureus* (de referência e isoladas de alimentos), incluindo também cepas de outras espécies do gênero. Elas foram analisadas por diferentes técnicas: através do perfil no API-Staph®³ e da amplificação de *nuc* por PCR. O amplicon 270 bp, correspondente ao gene *nuc*, foi obtido apenas nas cepas de *S. aureus* e não nas cepas pertencentes a outras espécies do gênero, demonstrando a especificidade do gene (PINTO; CHENOLL; AZNAR, 2005).

Diversos marcadores bioquímicos e genéticos para *S. aureus* podem ser utilizados para a identificação da espécie, sendo desde marcadores fenotípicos (Tabela 2), até a amplificação de genes espécie-específico (*nuc*, *coa*, *femA*, *tuf*, 16s rRNA, etc), *fingerprints* de DNA genômico e plasmidial, RFLP⁴ de fragmentos amplificados por PCR⁵ e RAPD⁶, a tipagem por PFGE⁷, PCR ou sequenciamento de um gene ou genoma (UENO; JORGE, 2002).

³ Kit comercial para identificação de espécies

⁴ RFPL: análise do genoma de microrganismos cortado com enzima de restrição

⁵ PCR: *polimerase chain reaction*.

⁶ RAPD: também conhecido como PCR com primer arbitrário (AP-PCR), retira o requerimento de primers escolhidos sem o conhecimento do genoma.

⁷ PFGE: *pulsed-field gel eletrophoresis*. A técnica consiste na análise de um grande fragmento de DNA gerado pela clivagem de um cromossomo intacto por uma enzima de restrição, e visto através de eletroforese de campo pulsado com mudanças periódicas na orientação do campo elétrico pelo gel.

Tabela 2

Testes bioquímicos para identificação da espécie <i>S. aureus</i>	
Carcterísticas	Fenótipo em <i>S. aureus</i> *
Catalase	+
Oxidase	-
Pigmento	+f
Crescimento em aerobiose	+
Crescimento em anaerobiose	+
Crescimento em 10% de NaCl	+
Crescimento em 15% de NaCl	f
Crescimento a 15°C	+
Crescimento a 45°C	+
Fosfatase alcalina	+
Redução de telurito	+
Coagulase	+
Fator Clumping	+
Proteína A	+
Termonuclease	+
Hemolisina	+
Purdação de ácido em manitol	+

Adaptado de Silva, Neusely et al (2010)

* +, 90% ou mais das cepas são positivas; -, 90% ou mais cepas são negativas; f, reação fraca; -f, reação fraca ou negativa;

Como dito, o *S. aureus* é capaz de causar intoxicação alimentar pela produção de toxinas, além de outros fatores de virulência. Ele está entre os cinco patógenos associados a DTA, nos Estados Unidos, representando 3% dos casos em que o patógeno é identificado. Porém, o *S. aureus* não aparece na lista de principais patógenos que levam a hospitalização e/ou a morte (E.U.A., 2011). De acordo com a classificação do *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF), ele causa DTA considerada do Grupo de Risco III, isto é: “doença de perigo moderado sem risco a vida, normalmente de curta duração sem sequelas substanciais com sintomas que são auto limitantes mas pode causar desconforto severo” (ICMSF, 2005).

No Brasil, dentre os agentes etiológicos bacterianos associados a surtos de DTA, o *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos (5,8%), atrás apenas da *Salmonella sp.*, em surtos registrados de 2007 a 2016 cujo o agente etiológico foi identificado (BRASIL, 2015). O *S. aureus* enterotoxigênico é um dos principais patógenos responsáveis por casos de intoxicação alimentar no mundo inteiro, sendo responsável por 241.148 casos de intoxicação alimentar nos Estados Unidos anualmente (E.U.A., 2011).

Em estudo realizado no Paraná sobre o perfil epidemiológico dos surtos de DTA ocorridos na região entre 2005 e 2008, o alimento mais frequentemente envolvido em surtos de DTA, correlacionado ao agente etiológico, foi o leite associado à presença de *Staphylococcus aureus* (30,4%) (ALMEIDA et al, 2013). Um outro estudo que analisou dados epidemiológicos dos surtos de DTA notificados em Chapecó, Santa Catarina, entre 1995 e 2007, mostrou que os microrganismos mais envolvidos, de um total de 61 casos, foram a *Salmonella sp.*, representando o agente etiológico de 54,0% dos surtos, seguido de *Staphylococcus aureus* com 13,1%, concordando com os dados nacionais do Ministério da Saúde para os anos subsequentes (MARCHI et al, 2011).

Em fazendas de produção de alimentos, é um dos principais agentes causadores de infecções na glândula mamária de vacas produtora de leite e por isso, vários estudos já isolaram esse microrganismo de leite cru e de amostras de tetas infectadas (ÂNGELO; ARCURI; ANDRADE, 2014; SANTANA, A. et al, 2012; SILVA, Nathalia et al, 2013). Na mastite crônica, o animal não responde bem a antibioticoterapia e, usualmente, as vacas infectadas precisam ser segregadas do rebanho ou levadas ao abate. Por isso, a mastite pesa como importante aspecto econômico na cadeia de produção de leite e derivados (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

1.4 ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA (ECN): DE CONTAMINANTE A PATÓGENO

Esse grupo heterogêneo foi, e ainda é, convencionado com base na necessidade de diagnóstico diferenciado com o patógeno *S. aureus* em amostras clínicas e demais cepas consideradas não patogênicas do gênero *Staphylococcus* spp. Entretanto, em hospitais ele tem sido frequentemente associado a casos de infecções nosocomiais, especialmente o *S. epidermidis* e o *S. haemolyticus* (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Diante desse quadro, pesquisadores vêm estudando a capacidade patogênica desse grupo, analisando a distribuição de clones e desenvolvendo novas antibioticoterapias.

Mesmo com o levantamento de dados epidemiológicos e isolamento de cepas resistentes aos glicopeptídeos, para amostras clínicas, a identificação em

nível de espécie no grupo dos ECN não é realizada rotineiramente no laboratório devido às dificuldades metodológicas e alto custo (BRASIL, 2013; AHLSTRAND et al, 2011).

Mas não é somente a isolados hospitalares que eles têm sido associados. Os ECN têm emergido como importante patógeno oportunista na medicina veterinária. Essas bactérias também são membros da microbiota na pele e mucosa de animais (NIJJAR; SMITH; ELTRINGHAM, 2014). Por habitarem tecidos de fácil colonização e penetração da glândula mamária, como a pele das tetas, também são chamados de microrganismos oportunistas (SANSANO, 2010). Em alguns casos, os ECN atingem a glândula mamária de vacas e podem ser transferidos ao leite (SANTANA, E. et al, 2010).

Na indústria de alimentos, ECN eram antes considerados contaminantes sem riscos à saúde do consumidor. Mas a descoberta de que ECN podem produzir toxinas exigiu reconsiderações, e sua importância na saúde pública tornou-se uma preocupação em maior escala, já que podem ser transferidos às tetas das vacas produtoras através de contato com utensílio e equipamentos de ordenha contaminados ou mãos de ordenadores não higienizadas (SANTANA, E. et al, 2010; NIJJAR; SMITH; ELTRINGHAM, 2014).

Em um estudo feito nos Estados Unidos em 2011, foram pesquisadas 19 enterotoxinas em 263 ECN isolados de vacas mastíticas e 31% foram carreadores de genes de enterotoxinas. Embora a produção da enterotoxinas estafilocócica não possa ser confirmada somente pela presença do gene, a alta prevalência de ECN carreando esses genes sugere que mais atenção deve ser dada à análise microbiológica de laticínios e às condições que ativam a produção dessas toxinas (PARK et al, 2011).

Em outro estudo no estado de São Paulo, 18 espécies de ECN foram isoladas de mastite bovina, e dentre elas estavam: *S. hyicus*, *S. warneri* e *S. epidermidis*, sendo este último o mais prevalente. Surpreendentemente, os genes que codificam para enterotoxinas foram mais prevalentes em ECN do que em *S. aureus*. Foi observado também nesse mesmo estudo que, aproximadamente, o dobro de ECN (64,4%) isolados carregou os genes para enterotoxinas clássicas, em relação ao *S. aureus* (32,2%) (GUIMARAES et al, 2013).

1.5 PATOGÊNESE: MECANISMOS E FATORES DE VIRULÊNCIA

Estafilococos tem a capacidade de colonizar e infectar hospedeiros humanos e animais, por meio de um arsenal de estratégias espécie-específico que os permitem aderência, agressão, invasão, sobrevivência e/ou evasão dos agentes da imunidade adaptativa. O *S. aureus* tem mecanismos de virulência mais esclarecidos e reconhecidos do que as espécies ECN, com exceção, da habilidade de formação de biofilme por *S. epidermidis*. Becker; Heilmann; Peters (2014) relatam que, no geral, ECN não possuem determinantes de virulência responsáveis por agressão. Mas fatores envolvidos na colonização podem contribuir para a interação bactéria-hospedeiro

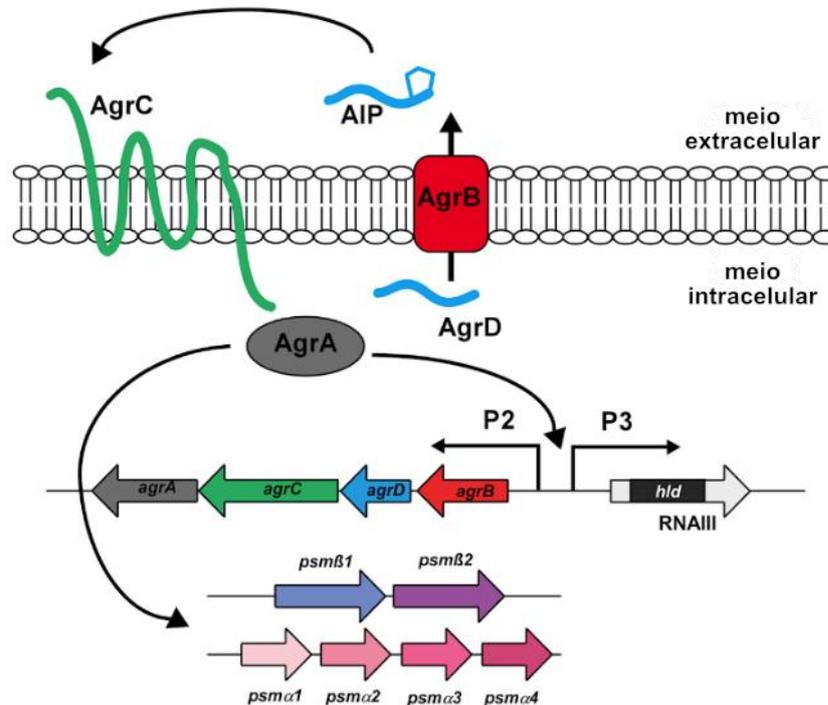
No caso do *S. aureus*, a base molecular da patogenicidade é multifatorial e depende da expressão de vários produtos de importantes classes de genes acessórios que compreendem proteínas de superfície celular e extracelulares. A expressão da maior parte dos genes de virulência de *S. aureus* é controlada pelo locus *agr* (JARRAUD *et al*, 2002). O locus *agr* codifica sistema de *quorum sensing*⁸ de *S. aureus*. Ele possui um gene acessório regulador (*argA*) e o acessório regulador estafilococal (*sarA*) (SANTANA, E. *et al*, 2010).

O sistema *quorum sensing* Agr é autorregulado e codifica uma via de sinalização cujo o ligante de ativação é um peptídeo de detecção de densidade bacteriana (Figura 1). Possui genes policistrônicos que são codificados em ambas as fitas que traduzem o *agrB*, que por sua vez, ativa o *agrD*, *agrC*, *argA* (RNA II) e *hld* (RNA III). Em síntese, esse sistema consiste de uma codificação estrutural de um sinal extracelular. A proteína Agr D intracelular sofre uma modificação ao transportar-se pela proteína de membrana Agr B e passa a ser reconhecida como um peptídeo autoindutor (AIP). Após determinado nível de concentração limite de AgrD-AIP (densidade populacional dependente), ocorre a ativação da autofosforilação das proteínas Agr C (proteína transmembrana). Ou seja, as proteínas Agr C transferem íons fosfato e ativa a Agr A, que é um regulador de resposta gênica (intracelular). O regulador, então, ativa a transcrição dos promotores AgrP2, AgrP3, *psmA* e *psm β* ⁹. Ou seja, é um sistema autorregulado.

⁸ Quorum sensing: sensor de densidade populacional através de moléculas específicas produzidas pelas cepas. Quanto maior a densidade populacional, maior o número de sinais, sejam elas ativadores ou inibidores.

⁹ PSM: Genes de modulinas solúveis em fenol. Importantes para formação de biofilmes.

Figura 1 – Sistema Agr.



Fonte: LE et al, 2014

O Locus *sar*, outro locus regulatório, codifica proteínas que se ligam ao DNA e ativam a expressão dos dois promotores (P2 e P3) no Locus *agr*. Estudos já realizaram caracterização do Locus *sar* e seus genes avaliando a influência de mutações na determinação da virulência (HEINRICHS; BAYER; CHEUNG, 1996; RECHTIN et al, 1999).

A expressão da patogenicidade dos estafilococos está relacionada a uma série de fatores, que quando determinados, permitem aderência a superfície, invasão ou supressão do sistema imune e causam efeitos tóxicos no hospedeiro. Esses fatores incluem componentes da superfície celular, exoproteínas (enterotoxinas e síndrome do choque tóxico) e Leucocidina Panton-Valentine (HOLMES et al, 2005).

1.5.1 Superantígenos (SA)

Os superantígenos (SA) são os mais potentes mitógenos de células T. Algumas dessas toxinas SA, estimulam a produção de células T mesmo em baixas

concentrações (10-15 mol/L). Atualmente, incluem-se nesse grupo 23 toxinas, sendo composto por enterotoxinas eméticas, enterotoxinas não eméticas (EE-like) e toxina da síndrome do choque tóxico (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

O padrão de SA encontrado em isolados de *S. aureus* é heterogêneo, assim como a quantidade de toxina produzida. Isso está intimamente relacionado a regulação dos genes acessório *argA* e *sarA*. A maioria é codificada em elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídeos, ilhas genômicas e ilhas de patogenicidade (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014);

Fleischer e Schrezenmeier (1988) descreveram o mecanismo de ação dos SA. Em contraste aos antígenos peptídicos usuais, os superantígenos estimulam ao menos uma célula T de 5, enquanto somente 1 em 10.000 são estimuladas durante apresentação de antígenos. Normalmente, os antígenos são capturados pelas Células Apresentadoras de Antígenos (APC) e sofrem proteólise. Os produtos (peptídeos antigênicos) se ligam as moléculas do Complexo de histocompatibilidade (MHC) e passam a ser apresentadas na superfície da APC como um complexo MHC-APC. Esse complexo é reconhecido pelas células T através de receptores de células T. Os SA são capazes de suprimir esse reconhecimento específico de antígenos feito pelas células T e APC. Eles se ligam diretamente ao complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) do antígeno celular fora do receptor de célula T convencional. Esse complexo reconhece diretamente o domínio V β do receptor da célula T. É sabido que o genoma humano codifica em torno de 50 receptores V β de células T e 20% das células T podem ser ativadas por SA.

1.5.1.1 *Enterotoxinas estafilocócicas (EE)*

Staphylococcus aureus podem produzir uma variedade de enterotoxinas eméticas (A-J e R-T) e enterotoxinas sem propriedade eméticas confirmadas - *EElike* - (K-Q e U-X). A maior parte das intoxicações alimentares (95%) são causadas pelas chamadas enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) codificadas pelos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* (ALLAM et al, 2014).

As EEB, EEC e EED são consideradas agr-dependentes (SANTANA, E. et al 2010). Já a EEA, até o momento, não tem mecanismos de regulação responsáveis pela sua produção reconhecidos (FERREIRA, 2015).

As enterotoxinas estafilocócicas causam toxicidade sistêmica e supressão da

resposta imune adaptativa (HAIT, 2012). As EE estimulam os neuroreceptores no trato gastrointestinal que transmitem a mensagem de êmese ao sistema nervoso central. Além disso, as EE são capazes de penetrar a parede do intestino e estimular a resposta imune no hospedeiro levando à liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, que também causam vômito. Essa resposta imune também parece ser responsável pelo dano causado no TGI associado à ingestão de EE, como lesões no estômago e no intestino delgado. Outros sintomas como diarreia, estão associados com a inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). A quantidade de enterotoxina necessária para causar sintomatologia, nos estudos de referência, é de que 1 ng/g (1 ppb) no alimento já seria suficiente (SANTANA, E. et al, 2010).

As EE reconhecidas atualmente formam um grupo de proteínas extracelulares sorologicamente distintas que compartilham as seguintes propriedades:

- Habilidade de causar êmese e gastroenterite em primatas;
- Superantigenicidade (ativação de células T seguido de choque sistêmico e liberação de citocina)
- Resistência ao calor, ao congelamento e à ação da pepsina e
- Semelhanças estruturais (dois sítios da molécula e uma ligação dissulfeto)

O peso molecular é em torno de 15 a 29 kD. A maioria das EE estão localizadas em elementos móveis, como plasmídeos, fagos ou ilhas genômicas. Assim, pode ocorrer transferência entre cepas, modificando a habilidade patogênica (ARGUDÍN, MENDOZA e RODICIO, 2010).

No caso do *S. aureus*, a produção de EE pode ocorrer na faixa de pH entre 4,5 – 9,6, sendo a faixa de pH ótimo a de 7- 8. O ambiente ótimo para produção é aeróbio mas pode ocorrer em ambiente anaeróbico. Podem ser produzidas a temperaturas entre 10 e 46° C, com temperatura ótima entre 40 e 45° C. (SANTANA, E. et al 2010).

Para detecção direta das enterotoxinas em alimentos existem metodologias específicas aplicáveis. Os métodos mais utilizados são ensaios biológicos, detecção molecular ou técnicas imunobiológicas. As técnicas imunológicas são baseadas na detecção química de anticorpos mono ou policlonais, preparados para a enterotoxina, que se apresentam como proteínas simples (SANTANA, E. et al, 2010). Existem kits comerciais disponíveis para detecção de EE em alimentos ou culturas (ALLAM et al, 2014).

Com relação à contagem de microrganismo mínima para detecção de EE, alguns estudos, feitos com *S. aureus*, convergem para afirmativa de que são detectáveis apenas quando as contagens de *S. aureus* ultrapassam 10^5 UFC/ml ou g de alimento (BENNETT; HAIT; TALLENT, 2015). Na maioria dos alimentos associados às intoxicações, contagens de 10^8 UFC/g ou valores superiores são raramente relatados (SANTANA, E. et al, 2010).

Cepas de *S. aureus* isoladas de humanos produzem frequentemente EEA, enquanto que as de vacas produzem EEC ou EED. No geral, um alto percentual de isolados de humanos saudáveis são produtores de EE (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

A EEH foi descrita pela primeira vez no mundo em um surto de DTA ocorrido no Brasil. Sete membros de uma família apresentaram sintomas de intoxicação alimentar ao realizarem uma refeição em restaurante *self-service*. Após investigação, foi detectada a presença de uma enterotoxina no queijo contaminado por *S. aureus*: a EEH (PEREIRA et al, 1996). As cepas carreadoras do gene *seh* ainda circulam no Brasil como mostra o estudo de Ferreira (2015) que caracterizou isolados de *S. aureus* de amostra de queijo minas frescal de fabricação artesanal e industrial em Goiânia. Foram analisados genes para diversas EE, e o gene mais encontrado foi o *seh* (37,9%).

Em isolados de leite de vaca saudáveis, o percentual de cepas enterotoxigênicas está entre 3,9% e 6%. A incidência de cepas produtoras de EE em vacas com mastite é de 14% a 41%, sendo essa variação associada a espécie da cepa (UNIÃO EUROPEIA, 2003).

A prevalência dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foi investigada em ECN de isolados de queijo Minas adquiridos em Botucatu, São Paulo. O resultado mostrou que 26% dos isolados ECN possuíam genes para enterotoxinas, mas nenhum produziu enterotoxinas *in vitro* (RALL et al, 2010). Porém ressalta-se, que em 1995, nos EUA, Bergdoll (1995) já havia relatado ECN produtores de até 10 ng/g de EE, detectadas através do método ELISA.

Veras et al (2007) analisaram laticínios envolvidos em surtos de DTA no Brasil de 1998 a 2002, e de 8 isolados ECN, 5 carregavam genes de enterotoxinas e as produziram em níveis detectáveis por ensaio imunológicos.

Alguns estudos detectaram a presença de genes de outras EE em amostras

de queijo. Costa e colaboradores (2012) analisaram *Staphylococcus sp.* em queijo Minas comercial e encontrou, através da técnica de PCR, um total de 34% dos isolados positivos para pelo menos um gene que codifica para enterotoxina.

1.5.1.2 *Toxinas Esfoliativas (TE)*

Outro tipo de toxina produzida pelos estafilococos são as chamadas toxinas esfoliativas (TE). São assim chamadas devido aos sinais clínicos das doenças a elas relacionadas: síndrome da pele escaldada (SSSS) e o impetigo bolhoso (BI) (FOX, 2015). A SSSS atinge principalmente neonatos, lactentes e crianças que não possuem anticorpos antitoxinas. É uma doença altamente contagiosa, caracterizada por eritema, febre, vômito e formação de bolhas superficiais frágeis que se rompem deixando áreas extensas expostas (ANEXO A), podendo levar a choque séptico (MUELLER; HAIMP; PETNEHAZY, 2010; DUGGAL et al, 2016). A depender da imunidade do hospedeiro, a toxina pode afetar a pele de maneira local como no BI (DUGGAL et al, 2016).

No caso dos neonatos, há o agravante da ausência da barreira protetora da pele. Isso pode levar a grandes perdas proteicas, de fluidos, hipotermia e infecções secundárias. Os pacientes ainda sofrem com muita dor devido à erosão da pele. O diagnóstico é feito pela observação da epiderme e histórico microbiológico (MUELLER; HAIMP; PETNEHAZY, 2010).

Existem três isoformas dessa toxina, associadas a humanos: TEA, TEB e TED, codificadas pelos genes *eta*, *etb* e *etd*, respectivamente, em diferentes elementos genéticos. O *eta* está localizado em um fago no genoma, o *etb* é encontrado em plasmídeos e o *etd* está em uma ilha genômica (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). A expressão das toxinas esfoliativas, está associada aos grupo Agr III e IV (JARRAUD, S. et al, 2000). Ladhani (2001) e Muller, Haimp e Patnehazy (2010) relatam que TEB é mais frequentemente isolada do que TEA em crianças com SSSS generalizada

Elas são proteases de serina que reconhecem e clivam as caderinas desmossômicas, estrutura molecular que liga as células epiteliais na camada superficial da pele, o que é diretamente responsável pela manifestação clínica da síndrome (BUKOWSKI, WLADYKA e DUBIN, 2010). Por isso, em 2008, foram

descritas como “tesouras moleculares”, já que facilitam a invasão percutânea das bactérias pela clivagem das moléculas de adesão (MUELLER; HAIMP; PETNEHAZY, 2010).

As isoformas possuem características distintas importantes para alimentos, como por exemplo a estabilidade e manutenção da atividade em temperaturas elevadas. A atividade da TEA é estável, mesmo até a 100°C por 20 minutos sendo inativada apenas por aquecimento a 100°C durante 40 minutos. No entanto, TEB é sensível ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (LUZ, 2008).

A pesquisa do fator de virulência para TEA e TEB foi negativa para 56 estafilococos resistentes a meticilina isolados de leite de vacas com mastite no estado de São Paulo (SILVA, Nathalia et al, 2013). Enquanto Salasia e colaboradores (2011), encontraram cepas de *S. aureus* de leite de animais com mastite na Indonésia com o gene *eta* (10/19).

1.5.1.3 Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST)

Teve seu reconhecimento por parte do público em geral, nos anos 1980, quando uma infecção de *S. aureus* causou a Síndrome do Choque Tóxico após o uso de absorventes internos femininos de determinada marca (BLOMSTER-HAUTAMAA et al, 1986). A bactéria em questão possuía a capacidade de se multiplicar rapidamente no material do absorvente interno, e permanecia somente na vagina. Apesar disso, a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST) se espalhava pelo corpo e causava os sintomas característicos (FOX, 2015).

É codificada pelo gene *tsst-1*, e causa febre, hipotensão e morte em humanos (ÂNGELO, ARCURI e ANDRADE, 2014). No entanto, a presença do gene tem sido verificada também em espécie animais e em isolados de alimentos, como por exemplo, em cepas isoladas vacas, de leite de vaca com mastite, leite cru e carnes (GÜNAYDIN, ASLANTAŞ e DEMIR, 2011).

O gene *tsst-1* está associado a elementos genéticos móveis, como fagos, ilhas de patogenicidade e plasmídeos, assim como as EE (ÂNGELO; ARCURI; ANDRADE, 2014). A partir disso, observa-se que a associação da presença de *tst-1* à presença de genes para EE, o que implicaria no aumento da patogenicidade dos isolados (FARAHMAND-AZAR et al, 2013).

Em um estudo com amostra de leite cru refrigerado coletadas no estado do

Rio de Janeiro verificou-se que 2,65% (7/264) amplificaram o gene *tst-1* nos *S. aureus* isolados (ÂNGELO; ARCURI; ANDRADE, 2014). Um outro estudo que analisou o genótipo toxigênico de *S. aureus* isolados de humanos saudáveis mostrou que dos 107 testados, 24,3% possuíam o gene para TSST (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

1.5.2 Citotoxinas

Como já mostrado, *S. aureus* pode causar uma variedade de patologias associadas à produção de exotoxinas. Mas além dessas exotoxinas consideradas “doença-específica” outras exotoxinas líticas (alpha, beta, gamma, delta toxinas e leucocidinas) podem ser produzidas por algumas cepas. Elas são chamadas de citotoxinas pois, causam citólise (através de enzima lisossomal) como resultado da degradação da membrana plasmática (BARON, 1996; FOX, 2015). Neste trabalho, serão discutidos os mecanismos de ação da Leucocidina de Pantón-Valentine e os achados na literatura sobre ela.

1.5.2.1 *Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)*

A leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) é uma citotoxina que causa destruição dos leucócitos e necrose de tecidos. Atua especificamente nos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e é um importante fator de necrose tecidual (BARON, 1996).

Estudos mostram que os efeitos tóxicos da PVL resultam da ação sinérgica de duas exoproteínas: LukS-PV e LukF-PV. Essas duas proteínas são codificadas por dois genes cotranscritos e adjacentes (*lukS-PV* e *lukF-PV*), que são carregados em bacteriófagos lisogênicos. Recentemente, o interesse na PVL tem crescido devido ao seu envolvimento em severas doenças em crianças e adultos sem exposição a ambientes hospitalares (HOLMES et al, 2005). O gene *pvl* está normalmente contido no genoma de bacteriófagos de *S. aureus* e durante uma infecção, o fago pode inserir o seu DNA na bactéria e tornar uma célula não-tóxica em uma bactéria capaz de produzir a toxina PVL (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007).

Os dois componentes da PVL são secretados antes de se ligar ao heptâmero de formação de poros na membrana dos PMN. Em altas concentrações a PVL causa

a lise no PMN enquanto baixas concentrações ativam uma nova via de apoptose de PMN pela ligação direta a membrana mitocondrial. A necrose tecidual pode resultar da liberação de espécies reativas de oxigênio dos PMN lisados. Ao mesmo tempo, os PMN lisados também liberam grânulos que ativam a resposta inflamatória, o que também pode levar a necrose tecidual (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007).

Holmes e colaboradores (2005) analisaram 515 cepas clínicas de *Staphylococcus sp.* de uma Unidade Epidemiológica Referência para Estafilococos da Inglaterra e do País de Gales e os resultados mostraram que uma proporção pequena (1,6%) carregava o gene *pvl*, sendo esse resultado similar a outros países. Sugere-se que o motivo disso seja a pouca susceptibilidade das cepas a infecção por fagos conversores de PVL.

Wang (2014) encontrou o gene *pvl* como o mais prevalente (75%) gene de virulência, entre genes para EE, TE e TSST, em 53 cepas de *S. aureus* isoladas de leite retirados de vacas com mastite e vacas saudáveis na China. Esses resultados contrastam com achados de Aires de Souza (2007) no Brasil, onde nenhuma cepa de *S. aureus* de leite de vacas com mastite subclínica carregava o gene *pvl*.

Em um estudo realizado em 2012 na Turquia com 81 cepas clínicas de ECN de vacas, retiradas de um laboratório veterinário, mostrou que 3,7% carregavam o gene *pvl*. Nenhuma cepa positiva para PVL carregava o gene de resistência ao antibiótico meticilina. Em contraste as cepas adquiridas no hospital, que geralmente são multirresistentes, esses isolados comunitários são sensíveis a muitos antimicrobianos, mas com frequência são produtores de PVL (UNAL e CINAR, 2012).

A maior parte dos estudos de pesquisa do gene *pvl*, envolvem somente cepa de *S. aureus* isolados de amostras clínicas. No entanto, estudos da ocorrência do gene *pvl* em espécies ECN em animais de produção e alimentos, assim como a caracterização de cepas do gênero *Staphylococcus sp.* com relação a presença do *pvl* ainda são limitados na literatura no Brasil.

1.6 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: EM ISOLADOS CLÍNICOS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL.

1.6.1 Cepas multirresistentes: é possível controlá-las?

Além dos fatores de virulência, relata-se o aumento da resistência a agentes antimicrobianos em estafilococos isolados de humanos, vacas com mastite e alimentos (GENTILINI et al, 2000; COELHO et al, 2009; COSTA, 2010; HOLMES et al, 2005).

Em torno de 50% dos antibióticos utilizados em humanos e 80% dos utilizados na veterinária poderiam ser dispensados sem consequências graves ao tratamento em andamento, segundo, Skov e colaboradores (2012). O uso de antibióticos deveria ser exclusivo ao tratamento de infecções das quais, de fato, interferisse no desfecho clínico. Os guias, políticas de uso, recomendações, cartilhas orientadoras para pacientes e profissionais da saúde são importantes, mas parecem não ser efetivos e, logo, uma abordagem mais radical pode ser necessária por parte das agências reguladoras (SKOV et al, 2012).

Tanto o ECP quanto o ECN compartilham a habilidade de acumular determinantes de resistência antimicrobiana resultando na formação de cepas multirresistente (SILVA, Nathalia et al, 2014). A resistência a antibiótico é considerada um fenômeno natural, mas que pode ser acelerada pela própria exposição da bactéria ao antibiótico. A pressão seletiva faz com que cepas resistentes sobrevivam e se multipliquem (WHO, 2014)

A classe de antibióticos mais utilizada na terapia contra infecções estafilocócicas é a dos beta-lactâmicos, representado principalmente, pelas penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, e também alguns da classe dos glicopeptídeos (ROHER; BERGHER BACHI, 2003).

1.6.2 Resistência a antibióticos em estafilococos

De acordo com o Relatório Global sobre resistência a antibiótico de 2014 da OMS, a resistência a metilina em *S. aureus* é muito frequente em infecções hospitalares. O levantamento desses dados teve como objetivo o desenvolvimento de estratégias para o controle da disseminação dessas cepas (WHO 2014).

No contexto histórico dos antibióticos, a introdução da metilina em 1959 tinha finalidade de ser menos susceptível as beta-lactamases expressas por linhagens resistentes a penicilina. Mas o início da emergência de cepas de *S. aureus*

resistentes a metilina (MRSA10) e de outras variantes multirresistentes, logo se estabeleceu (DAVIES e DAVIES, 2010). Hoje, cepas MRSA são definidas por “cepas de *S. aureus* que desenvolvem resistência a beta- lactâmicos e cefalosporina” (FOX, 2015).

A resistência a metilina no gênero *Staphylococcus sp.* é devido a aquisição do cassete cromossomial *SCCmec*, considerado uma ilha de resistência, pois possui o gene *mecA*, que codifica resistência a metilina, além de genes para recombinases (*ccr*) específicas para sua integração e excisão. O *mecA*, que também pode estar contido nos estafilococos coagulase negativa resistentes a metilina, pode ser transferido horizontalmente entre os estafilococos (UNAL e CINAR, 2012). Mas a aquisição evolutiva parece ter sido proveniente de outra espécie, já que o conteúdo G+C11 desse cassete difere dos demais cromossomos de *Staphylococcus spp.*(ROHRER; BERGER-BÄCHI, 2003).

Roher e Berger-Bachi (2003) esclareceram como a biossíntese da parede celular de peptídeoglicana de *S. aureus* impacta na resistência aos beta-lactâmicos. As Proteínas Ligadoras de Penicilina endógena (PBP) pertencem a família das transferases e catalisam a reação de transpeptidação da fase final da síntese da parede celular de peptídeoglicana. Essa reticulação (*cross-linking*¹²) ocorre através de um diaminoácido do peptídeo final da formação da parede.

As proteínas da família FemABX (FemA, FemB, FmhA, FmhB, FmhC), sintetizadas pelo operon *femAB*, adicionam um ou mais aminoácidos ao peptídeo final da peptídeoglicana, de forma sequencial. Nas espécies estafilocócicas, os aminoácidos adicionados normalmente são glicina, alanina ou serina e são chamados de interpeptídeos. FemA ou FemB foram identificados em todas espécies de *Staphylococcus spp.* estudadas por Berguer e Bachi (2003). Os fatores *fem* (*factor essential for methicilin resistance*) são genes constitutivos (“*housekeeping*”), ou seja, são responsáveis por funções metabólicas essenciais e rotineiras. Em estafilococos, mutações nesses genes afetam o conteúdo de glicina da parede celular. Com isso, forma-se uma parede mais grossa e anormal devido ao *turnover* deficiente dos peptídeos (ROHRER; BERGER-BÄCHI, 2003).

¹⁰ MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

¹¹ Conteúdo G+C é o percentual de bases nitrogenadas em uma molécula de DNA que são guanina ou citosina.

¹² *Cross- linking*: ligação entre as peptídeoglicanas da parede celular, podendo ser direta ou via um interpeptídeo.

A resistência intrínseca a meticilina atribuída a presença do gene *mecA*, ocorre através de uma proteína de 78-kDa chamada Proteína Ligadora de Penicilina 2a (PBP2a ou PBP2') que possui baixa afinidade aos beta-lactâmicos (MEHROTRA, WANG; JOHNSON, 2000). Tanto as PBPs como as PBP2a lidam mal com modificações da parede celular de estafilococos com mutações nos genes *fem*, especialmente pela ausência de interpeptídeos. Com isso, as células mutantes perdem a resistência a meticilina e se tornam, às vezes, hipersensíveis a diversos antibióticos (ROHRER; BERGER-BÄCHI, 2003).

O SCC*mec* é classificado em 7 subtipos (subtipo I até VII), baseado na sequência do *mec* e do *ccr*. Estudos anteriores (Juan Li, 2013; J. Robert, 2011; VIEIRA, 2014) mostraram que infecções de MRSA associados a ambientes hospitalares (HA-MRSA), do qual há uma predisposição a um fator de risco, são normalmente multirresistentes e carregam os subtipos SCC*mec* I, II e III, mas quase nunca o tipo IV. Em contraste a isso, cepas MRSA associadas a comunidade (CA-MRSA), que ocorrem em indivíduos saudáveis, mostram uma habilidade virulenta aumentada (produzem PVL) e maior susceptibilidade a antibióticos não beta lactâmicos e carregam SCC*mec* tipo IV, V e VII (DELEO et al, 2010).

Nos últimos anos, os HA-MRSA saíram do ambiente hospitalar para de tornar o patógeno mais adquirido em comunidade carregando potencial virulento e habilidade de transmissão de suas características (DAVIES e DAVIES, 2010).

A opção terapêutica a cepas MRSA são os glicopeptídeos. Entretanto, estirpes resistentes ou com resistência intermediária a todas as drogas usadas clinicamente em humanos, além dos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, já foram descritas por Hiramatsu e colaboradores em 1997 no Japão. Resistência à vancomicina associada a plasmídeos já foi detectada em alguns enterococos. E os determinantes dessa resistência podem ser transferidos de enterococos a estafilococos *in vitro*, mas também pode ocorrer *in vivo*.

O *S. aureus* expressa também resistência a antissépticos e desinfetantes, como os compostos quaternário de amônio, o que pode implicar na sua sobrevivência em ambiente hospitalar e indústria de alimentos (BARON, 1996).

Desde o início da era dos antibióticos, a sobrevivência de cepas de *S. aureus* em ambientes estressados por antibióticos pode se dar pela aquisição de determinantes de resistência que as favorecem no ambiente, através de vários mecanismos genéticos, incluindo aquisição de plasmídeos, adição de informação

genética no cromossomo via transposons ou outros tipos de inserção no DNA e mutações em genes (Tabela 3) (BARON, 1996).

Tabela 3

Resistência antimicrobiana		
Antimicrobiano	Mecanismo de resistência	Elemento genético
Penicilina	B lactamases, inativação enzimática da penicilina	Plasmídeo
Meticilina (oxacilina)	Expressão de uma nova penicilina resistente e proteína de ligação da penicilina	Cassete cromossomial adquirido de forma desconhecida
Tetraciclina	Efluxo celular	Plasmídeo
	Modificação do ribossomo	Locus cromossomial adquirido de forma desconhecida
Cloranfenicol	Inativação enzimática	Plasmídeo
Eritromicina	Modificação enzimática do rRNA	Plasmídeo
		Transpóson no cromossomo
Estreptomicina	Mutação na proteína ribossomal	Mutação no gene que codifica para o receptor da droga
	Inativação enzimática	Plasmídeo
Gentamicina	Inativação enzimática	Plasmídeo
		Transpóson no cromossomo

Fonte: Adaptado de *Medical Microbiology. 4th edition. Baron. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.*

MRSA são uma das principais preocupações também na saúde animal. O isolamento dessas cepas em animais foi relatado pela primeira vez em 1972, após a sua detecção em leite de vacas mastíticas (DEVRIESE; VAN DAMME; FAMEREE 1972). Cepas MRSA já foram detectadas em fazendas agropecuárias, e Huber et al (2010) consideram que os trabalhadores desses locais são potenciais carreadores desse tipo de bactérias. Ho e colaboradores. (2012) detectaram MRSA em frangos e porcos na China.

A gestão do tratamento para infecções com ECN é limitada pela confiabilidade dos testes fenotípicos de sensibilidade, já que a expressão da resistência a beta-lactâmicos é ainda mais heterotípica do que nos casos com *S. aureus*. Com isso, por questões de segurança, usam-se antibióticos de baixo potencial, independentemente dos resultados de susceptibilidade (NIJJAR; SMITH;

ELTRINGHAM, 2014).

O tratamento antibiótico para as infecções com *S. aureus* em vacas não elimina a doença, mas em alguns casos diminuiu o tempo da duração da infecção. O efeito do tratamento diminuiu de acordo com o avanço da idade do animal e com progresso da primeira lactação. A taxa de cura foi em 34% quando 89 vacas na Dinamarca foram tratadas contra mastite subclínica causada *S. aureus* (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

Dentre os agentes antimicrobianos aprovados para uso em mastite bovina, os beta-lactâmicos, como as penicilinas e as cefalosporinas, têm papel chave. A resistência a beta-lactâmicos em estafilococos é mediada ou por beta lactamases codificadas pelo gene *blaZ* ou por PBP2a codificada por *mecA*, que tem uma afinidade reduzida a todos antibióticos beta-lactâmicos disponíveis para tratamento de mastite (FESSLER et al, 2010).

Coelho (2009) analisou *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica no Rio de Janeiro e 42% dos isolados de *S. aureus* eram resistentes a todos os antibióticos testados: ampicilina (10mg), gentamicina (10mg) penicilina (10 IU), oxacilina (1mg), vancomicina (30mg) e ampicilina/sulbactam (10ng) (COELHO et al, 2009).

Um estudo em 2010 de susceptibilidade a antibióticos por disco difusão feito com 95 *Staphylococcus spp.* obtidos de 30 amostras de queijos Minas Frescal demonstrou que 14 (14,7%) isolados mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados (mupirocina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, norfloxacin, cefotaxima, piperacilina+tazobactam, meropenem, penicilina-G, cefepima, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, oxacilina, cefoxitina e vancomicina.), 15 (15,8%) isolados apresentaram-se resistentes à cefoxitina e 14 (14,7%) resistentes à oxacilina, juntamente a um adicional possuindo resistência intermediária à oxacilina (COSTA, 2010).

Isolados nosocomiais de *S. epidermidis* são normalmente resistentes a diversos antibióticos incluindo a meticilina. (BARON, 1996). Mas Fontes et al (2013) isolaram ECN de queijo minas com esse mesmo padrão de multirresistência das cepas clínicas.

Humanos carreadores assintomáticos de bactérias com genótipo de virulência e resistência a antibióticos podem atuar como ordenhadores ou manipuladores de

alimentos. Assim como animais com infecções subclínicas podem produzir alimentos contaminados que serão comercializados. Essas cepas podem ter suas habilidades virulentas transferidas a outras bactérias através de elementos móveis e/ou permanecerem viáveis em toda a cadeia de produção de um alimento. Portanto, não somente atenção à caracterização de isolados é importante, como o também o controle de cada etapa da produção até que o alimento chegue ao consumidor final, uma vez que os alimentos de origem animal são os mais comumente envolvidos em surtos de DTA.

1.7 CONSUMO DE PRODUTOS LÁCTEOS E A PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

Entre os anos 2007 e 2016, o leite e seus derivados foram responsáveis por 2,6% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, ficando em 4º lugar entre outros 14 tipos de alimentos (BRASIL, 2016).

Segundo os dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (Abiq), em 2011 o país produziu 867 mil toneladas, aumentando a produção em 9,4% com relação a 2010. Além disso, estima-se que a produção nacional de queijos em 2014 tenha atingido um milhão e cem mil toneladas nas empresas sob inspeção federal (SEBRAE, 2014).

O queijo tipo Minas frescal é um produto tipicamente nacional, de tecnologia simples e de larga aceitação no país (BRANDÃO et al, 2013). O queijo Minas artesanal é fabricado nas regiões das Serras da Canastra, Serro e Salitre, em Minas Gerais, desde os tempos coloniais (PERRY, 2004).

A última Pesquisa Orçamentária Familiar (2008-2009) mostrou que o Município do Rio de Janeiro está entre as áreas urbanas com maior aquisição alimentar per capita anual de queijo Minas (BRASIL, 2010). Isso demonstra que o queijo Minas tem ampla aceitação comercial e está inserido na rotina alimentar dos brasileiros no Rio de Janeiro.

Devido a sua alta umidade (>55%) e pH de baixa acidez (5,1 – 5,6), torna-se um alimento mais susceptível ao crescimento bacteriano e a produção e manutenção de enterotoxinas do que outros queijos considerados duros. Essas características limitam seu tempo de prateleira, além de o tornar um potencial causador de DTA, já que nele uma bactéria tem mais chances de se desenvolver em

níveis patogênicos (SANTANA, A. et al, 2012; SILVEIRA-FILHO et al, 2014).

Outros fatores associados a produção, são determinantes dos níveis de microrganismos no queijo: pasteurização ineficaz, a contaminação pós-pasteurização, a inadequada manutenção da cadeia de frio durante estocagem e o transporte da matéria-prima e do produto final (HIDALGO et al, 2006). As condições de higiene são uma preocupação constante para evitar a entrada e o desenvolvimento de microrganismos que possam contaminar o produto, uma vez que a segurança do consumidor implica também em fatores econômicos (VICENTINI et al, 2013).

O queijo Minas frescal é um queijo branco produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, com adição de “cultura starter”, seguido da adição de cloreto de cálcio, coalho enzimático ou químico e remoção do soro para moldagem e salga (HIDALGO et al, 2006) (ANEXO B).

A primeira etapa para obtenção do queijo é a de retirada do leite do úbere do animal (ordenha). Ela feita por máquinas na produção industrial, sendo a manutenção do equipamento de suma importância para evitar a sensibilização excessiva das tetas e a pré-disposição a inflamações.

Por ser uma etapa crítica, a ordenha exige atenção aos seguintes pontos: local da ordenha; condições inerentes ao animal, condições e tipos de equipamentos, utensílios, capacitação dos funcionários envolvidos; limpeza das tetas; realização de testes rápidos no leite ordenhado para verificação da saúde animal; observação dos cuidados necessários dispensados ao leite pós-ordenha e tratamento das tetas (SILVA; SILVA; FERREIRA, 2012).

A etapa de adição da cultura láctica (“cultura starter”) é etapa mais importante para que limite-se o crescimento de estafilococos e outros contaminantes durante o processo. É comum ocorrer infecção da cultura starter por bacteriófagos (ICMSF, 2005).

Sendo assim, nas etapas subsequentes a ordenha, o produtor deve manter-se atento a higiene pessoal e à saúde dos empregados, à limpeza e à manutenção dos equipamentos e do ambiente de trabalho. A sanitização deve ser feita imediatamente antes do uso do equipamento e no final do expediente ou no caso de interrupções demoradas. E embora o uso de detergentes promova a limpeza das superfícies pela eliminação de resíduos, a sanitização não elimina microrganismos (SILVA, F., 2005). Condições higiênicas inadequadas de equipamentos ou

manipuladores podem levar a recontaminação do leite após a pasteurização (ICMSF, 2005).

É necessário o crescimento de estafilococos toxigênico na ordem de 1 a 5 milhões células por grama de alimento durante a produção do queijo para produzir quantidade de enterotoxinas detectáveis por ensaios (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

Como o mercado exige cada vez mais produtos de qualidade higiênico-sanitária adequada, é necessário que as indústrias sejam vinculadas a sistemas e processos que visam atender às condições impostas pela legislação vigente (SILVA; SILVA, 2012).

A elaboração e implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) contempla a qualidade da matéria-prima e dos ingredientes, incluindo a especificação de produtos e a seleção de fornecedores, a qualidade da água, bem como o registro em formulários adequados de todos os procedimentos da empresa, até as recomendações de construção das instalações e de higiene. Esses sistemas são considerados pré-requisitos para aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) ou *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP), que tem como objetivo identificar, controlar e evitar os pontos e fatores de riscos das possíveis contaminações, sejam elas físicas, químicas ou por microrganismos indesejáveis (SILVA, F., 2005; SILVA; SILVA, 2012).

1.8 MÉTODOS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

Os métodos de análise microbiológica de alimentos são baseados em testes morfológicos e provas bioquímicas para a tipagem, subtipagem e identificação em nível de gênero e espécie. As técnicas frequentemente usadas são feitas através da semeadura em meio de cultura (seletivos ou não seletivos) complementadas por provas bioquímicas, que revelam características fenotípicas da bactéria. Entretanto, tais características podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas (GANDRA, 2008).

Para enumeração de ECP e ECN usam-se técnicas convencionais através de contagem direta em placa em meio de cultura específico seletivo, como o ágar Baird Parker com gema de ovo ou Ágar Baird Parker contendo fibrinogênio, plasma de

coelho, inibidor de tripsina e telurito de potássio (BUYSER, et al, 2003; HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2011). Ambos são recomendados para alimentos dos quais se espera ter crescimento de mais de 100 células de *S. aureus*/grama. O fibrinogênio é adicionado para estimular a atividade da enzima coagulase. O plasma de coelho atua como substrato mais específico para a ação da coagulase (BECKERS et al, 1984).

Outro meio muito utilizado na enumeração de estafilococos é o ágar manitol salgado (MSA). Esse meio normalmente contém extrato de carne e peptonas como nutrientes para o crescimento das bactérias, e obrigatoriamente contém cloreto de sódio (7,5%) como fator inibidor de crescimento de bactérias não estafilocócicas. O manitol é o carboidrato fermentável, que, quando degradado, produz um ácido detectado pelo indicador de pH presente no meio e causa mudança de coloração (BENNETT; LANCETTE, 1998)

As principais características seletivas utilizadas nos meios de cultura e testes para a seleção de *S. aureus* são: a habilidade de crescer em 15% de NaCl, reduzir telurito de potássio, crescer em cloreto de lítio, glicerina, resistência a polimixina, hidrólise de gema de ovo, utilizar manitol como carboidrato fonte de fermentação, crescer a 42-43°C, atividade da coagulase e atividade da termonuclease (SILVA, Neusely et al, 2010).

Há divergências entre os guias de recomendação de procedimentos em microbiologia do Brasil. Especialmente, no que diz respeito ao meio de cultura a ser utilizado com a finalidade de enumeração de estafilococos. Enquanto o Manual de Microbiologia Clínica da ANVISA indica o uso do ágar manitol salgado na análise de amostras clínicas, o Ministério da Agricultura recomenda o uso do ágar Baird Parker para a enumeração de ECP na análise de alimentos (BRASIL, 2013; BRASIL, 2003). Embora sejam convenções amplamente acatadas, não bem esclarecida a razão dessa diferença de recomendação. Possivelmente isso ocorre, em virtude dos isolados clínicos normalmente serem unibacterianos, ou seja, não possuem população com várias espécies. Com isso o ágar manitol salgado se torna um meio adequado por ser mais seletivo a espécies não-*S.aureus*. Outro fator que pode ter implicância no uso dos meios citados acima é o custo. Os principais fornecedores de suprimentos laboratoriais realizam cotação de um frasco com 500 g de ágar manitol salgado em pó entre R\$175,00 e R\$323,00. Já o ágar Baird Parker está R\$299,23 e R\$882,12, sem cotar os suplementos, como por exemplo o fibrinogênio e plasma de

coelho que pode chegar a até R\$1589,00 (HEXIS CIENTÍFICA, 2017; LABOR SHOPPING, 2017; LOJA SYNTH, 2017; LUDWIG BIOTEC, 2017a, b).

Portanto, como o uso para a identificação de espécie em amostra clínica é usado amplamente em hospitais e serviços de vigilância epidemiológica requer, provavelmente, o uso de meio que tenha melhor custo-benefício.

Gandra e colaboradores (2008) verificaram um aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Destacam-se as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela PCR, instituída pioneiramente por Kary B. Mullis em 1985.

A PCR é uma técnica altamente sensível, específica e rápida, por meio da qual são obtidas milhões de cópias de ácidos nucleicos a partir de diminutas quantidades de sequências de DNA ou de RNA específicas, através da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação, anelamento e extensão do DNA (GANDRA et al, 2008).

Sequenciamento de 16S rRNA, uma região conservada em todas as bactérias, tem sido implantando nos laboratórios para a identificação de espécies de ECN. Embora esse método seja confiável e amplamente utilizado, o alto grau de similaridade entre as espécies mais próximas limita seu uso para identificação de algumas espécies. Genes alvos alternativos como o *rpoB*, *tuf*, *hsp60* e *sodA*, podem ser utilizados de forma eficiente na distinção de espécies similares (HWANG et al, 2011; SASAKI et al, 2010).

O gene *tuf*, por exemplo, codifica, o fator de alongação Tu, é um constituinte essencial do genoma bacteriano envolvido na formação da cadeia peptídica. É muito utilizada para fins de diagnóstico. A análise no gene *tuf* tem se mostrado um método reprodutível e confiável para a identificação de ECN, e também melhor poder distintivo entre certas espécies do que o sequenciamento do 16S rRNA (HWANG et al, 2011; OKOLIE et al, 2015)

A hibridização do DNA e a PCR também são alternativas para detectar isolados estafilocócicos carreadores de sequencias genéticas de produção de toxinas. Porém devido ao crescente número de EE descritas, torna-se cada vez mais inviável o desenvolvimento de um único ensaio PCR capaz de detectar todas as EE

(BLAIOTTA et al, 2004). Mas em casos de pesquisa de genes para EE clássicas já existem protocolos desenvolvidos (BLAIOTTA et al, 2004; ERTAS et al, 2010; LØVSETH; LONCAREVIC; BERDAL, 2004; OKOLIE et al, 2015).

Dentro das técnicas utilizadas para identificar genotipicamente as toxinas, a hibridização DNA-DNA e a PCR são ditas como confiáveis e eficientes (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000). Por outro lado, esses métodos possuem duas principais limitações: a cepa de estafilococos deve estar isolada do alimento e os resultados informam a presença ou ausência do gene que codificam para a toxina, mas não dão informação sobre a expressão desses genes no alimento. Portanto, esse método não pode ser usado como diagnóstico de surto de origem alimentar (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2011).

O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o método padrão ouro de alto rendimento para a detecção de compostos protéicos até mesmo em quantidades nanomolares em um grande número de isolados. Mas o tempo para o desenvolvimento do teste pode chegar até 1 ano, muitas vezes, possui alto custo (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2011).

O *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) da *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda uma metodologia para detecção de EE. O Manual apresenta uma técnica de cultura de cepas de estafilococos, procedimentos para extração da enterotoxina e os métodos sorológicos indicados. Esses métodos são: teste de precipitação de dupla difusão em *microslide* gel, ELISA, ensaio imunológico quantitativo e eletroforese em gel de poliacrilamida-imunoblástica.

1.9 LEGISLAÇÃO: REGULAÇÃO NA PRODUÇÃO E CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS

O MAPA publicou, em 2002, a Instrução Normativa (IN) nº 51 (BRASIL, 2002) que regulamenta a produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado de vaca. Em 29 de dezembro de 2011, o mesmo órgão publicou a IN nº 62 (BRASIL, 2011), que além de complementar a IN nº 51, oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003).

Em 1999, a IN nº 42, alterou e atualizou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), um monitoramento que verifica “a presença e

os níveis de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como resíduos de produtos de uso veterinário, de agrotóxicos ou afins, e de contaminantes químicos (aflatoxinas, metais pesados, contaminantes inorgânicos, dioxinas, dentre outros)” em carne, mel, leite e pescado.

As IN são ferramentas essenciais para garantir a qualidade e a segurança do leite utilizado como matéria-prima do queijo fornecido à população brasileira e aos consumidores mundiais (BRASIL, 2009).

A Resolução RDC nº 12/2001 é o regulamento técnico brasileiro publicado pela ANVISA que determina padrões microbiológicos para diversas categorias de alimentos. Dentro dela, a legislação brasileira estabelece padrões microbiológicos do queijo Minas frescal com relação à contagem de ECP (BRASIL, 2001).

O item 8-B do Anexo I da RDC 12 estabelece padrões para vários tipos de queijos. O queijo Minas frescal industrializado se encaixa no subtipo “de muito alta umidade 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, minas frescal, muçarela (mozzarella, muzzarella) e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas”. A contagem de ECP de tolerância para amostra indicativa é de 5×10^2 UFC/g. No caso de amostra representativa, recomenda-se um n de 5 unidades amostrais, sendo o limite máximo (M) de 5×10^2 , o limite que classifica o produto como intermediário (m) de 5×10 UFC/g, podendo esse ser encontrado em até 2 unidades (c)¹³.

Sobre a produção de toxinas, possui um adendo que diz que, para o estabelecimento do padrão microbiológico, pode ser feita a caracterização dos microrganismos e/ou suas toxinas considerados de interesse sanitário. Diz também que a determinação da capacidade de produção de toxina estafilocócica de cepas isoladas pode ser realizada a fim de se obter dados complementares. Além disso, diz que nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por “ausência” na descrição, o resultado positivo de uma amostra indicativa é interpretado para todo o lote ou partida. O mesmo se aplica quando for detectada a presença de toxinas em quantidades suficientes para causar doença no consumidor, ou seja, a presença ou

¹³ Na RDC nº 12, para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se: “m” como o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; “M” como o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, “M” separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis; “c”: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes).

a quantificação de toxina caracteriza o produto como “em condições insatisfatórias”.

O queijo Minas é um alimento tipicamente brasileiro, por isso, só há referências brasileiras a respeito de seu padrão microbiológico. Mas baseado nas características físico-químicas e modo de produção deste queijo pode-se extrapolar seus critérios a padrões válidos em outros países.

O Regulamento 2073/2005 da Comissão Europeia, diz respeito a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios, estabelece critérios microbiológicos para certos microrganismos e as regras de execução a serem cumpridas pelas indústrias.

Para queijos de pasta mole não curados recomenda-se que a contagem de ECP seja de até 10 UFC/g, com método de análise de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO) 6888-1 ou 6888-2. Com relação às EE em queijos, descrevem que elas não devem ser detectadas em 25 g de alimento e que a análise seja feita de acordo com a recomendação do Laboratório de Referência (LCR).

O item 1.121 da 2073 refere-se à detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em queijos feitos com leite cru ou tratado termicamente, quando a contagem de *S. aureus* é maior do que \log_5 UFC/g¹⁴. O método analítico de referência do item é o *European Screening Method* do LCR para ECP, incluindo o *S. aureus*, para análise de leite, alimentos à base de leite e outros alimentos.

A detecção consiste em:

- Extração-concentração: recuperação da toxina da amostra através de centrifugação de diálise;
- Pré-tratamento usando IgG de coelho;
- Detecção imunoenzimática através de kits comerciais.

A FDA, nos EUA, elaborou um guia para seus fiscais orientarem-se quanto as conformidades a serem detectadas na produção de produtos lácteos, especialmente durante e após a etapa de pasteurização.

Nessa recomendação, enfatiza-se a detecção de toxinas em laticínios que se encontram em condições inadequadas de produção, armazenamento e transporte.

¹⁴ A conversão de UFC/g em notação científica para logaritmo é feita calculando-se o log na base 10 do valor em número inteiro. Exemplo, o valor em notação de $1,0 \times 10^4$ UFC/g, é equivalente a 10000, em logaritmo seria $\log_{10} 4$ UFC/g. Observação: A apresentação da base “10” no log é dispensável.

Mas orientam que, uma contagem de *S. aureus* em leite e derivados maior do que $\log 4$ UFC/g indica que o alimento foi produzido em condições sanitárias inadequadas (E.U.A., 2010).

A indústria deve verificar frequentemente os Pontos Críticos de Controle para a presença ou indicação de crescimento de estafilococos e testar queijos para *S. aureus* e/ou termonuclease em caso de alterações na cultura láctica ou outras condições de perigo forem observadas (E.U.A., 1985)

Le Loir; Baron e Gutier (2003) relatam que a sensibilidade dos testes de rotina é em torno de $\log 2$ UFC/g para alimentos sólidos. Em vários países uma contaminação baixa até 10^3 UFC/g de *S. aureus* é considerada aceitável e sem risco a saúde pública, mesmo em produtos feitos dentro das BPF, em leite cru na França.

Nenhuma das legislações trata a respeito do risco de contaminação dos alimentos por ECN. A maior parte delas considera o ECN apenas como um comensal de leite e derivados. Além disso, devido o número pequeno de espécies que causam DTA em humanos, não são considerados nos critérios microbiológicos, nem para indicação de condições sanitárias.

Em comparação as regulamentações internacionais aqui descritas, a legislação brasileira encontra-se em defasagem quanto à detecção de EE, tanto no aspecto quantitativo, quanto analítico. A CE já estabelece valores e método de análise de referência para servir como critério de avaliação para queijos (UNIÃO EUROPEIA, 2005).

Embora haja métodos de referência internacional em comum (ICMSF, *American Public Health Association*), o critério para ECP para queijos com características semelhantes ao Minas nas diretrizes são distintos, variando em até uma potência. Isso amplia ainda mais a discussão sobre a quantidade ECP tolerável em queijos com muita alta umidade, considerando todo o potencial virulento já conhecido nas espécies *S. aureus*.

1.10 JUSTIFICATIVA

S. aureus é um dos principais causadores de surtos de DTA. Seu potencial virulento é reconhecido e bem descrito na literatura, porém ele não é o único microrganismo que causa preocupação. Estafilococos coagulase negativa (ECN) foram isolados de matrizes alimentares e, além de carregarem genes para virulência,

eles produzem toxinas e são envolvidos em surtos de DTA ao redor do mundo.

O recorrente isolamento de estirpes que possuem genes codificadores de enterotoxinas em laticínios justifica a necessidade de um estudo que envolva um queijo brasileiro consumido tipicamente fresco, o queijo Minas frescal. Somado a isso, a pesquisa pode tornar-se um caminho para discussão da aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) nas indústrias beneficiadoras de leite e produtoras de queijo e da regulamentação que cerca o tema.

No Brasil, já há estudos sobre queijo Minas frescal e a detecção de enterotoxinas clássicas, porém, artigos que envolvam detecção de toxina da síndrome do choque tóxico, leucocidina de Pantón-Valentine e toxinas esfoliativas em *S. aureus* e ECN isolados provenientes dessa matriz são escassos.

Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a rede de produção de alimentos é uma das principais situações de ocorrência de microrganismos com resistência a antimicrobianos. Com isso, os esforços das agências com relação às bactérias provenientes de hospitais estão sendo extrapolados aos agentes envolvidos com a produção de alimentos.

As vigilâncias sanitárias (VISA) municipais atuam no controle sanitário dos pontos de venda de queijo Minas e na notificação e repasse de casos de DTA envolvendo esse alimento. Enquanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula a produção desse alimento e fornece ferramentas para aplicação de suas normas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) controla a qualidade, transporte e armazenamento da matéria prima e condições de produção do gado leiteiro. Ou seja, a união desses órgãos é de suma importância para a oferta de um produto final adequado.

Tendo em vista o exposto, acredita-se que é um tema central para a manutenção da qualidade dos alimentos oferecidos a população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de genes para enterotoxinas clássicas, toxina da síndrome do choque tóxico, toxina esfoliativas e leucocidina de Panton-Valentine e de resistência a meticilina de estafilococos isolados de queijo tipo “Minas frescal” vendidos em grandes redes de supermercados na cidade do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de contaminação por *S. aureus* e coagulase negativa de amostras de queijo Minas frescal através de contagem em placa em ágar Baird Parker-RPF (BPA-RPF) e em ágar manitol salgado (MSA);
2. Isolar e identificar a espécie *Staphylococcus aureus* através da amplificação de gene espécie-específico e detectar espécies ECN pela PCR;
3. Amplificar e detectar genes que codificam enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC e EED), Leucocidina Panton-Valentine (PVL), toxinas esfoliativas (ETA, ETB e ETD) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) nos isolados através da PCR;
4. Amplificar e detectar gene marcador para a resistência a meticilina (*mecA*) nos isolados através da reação em cadeia da polimerase.

3 METODOLOGIA

A amostragem, a contagem em placa e os procedimentos internos do laboratório foram baseados nas recomendações da *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* e no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, da AOAC no *Official Methods of Analysis of Association of Analytical Communities*, da *Food and Drug Administration* (FDA) descritas no *Bacteriological Analytical Manual* e nas normas da *International Organization for Standardization* (ISO).

A extração de DNA seguiu de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial utilizado, baseando-se na seção do manual de procedimento para a purificação de DNA de bactérias do kit *Genomic DNA from tissue da NucleoSpin® Tissue, Kit* (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016)

A PCR foi baseada nos artigos de Da Cunha et al (2006), Indrawattana et al (2013), Morot-Bizot; Talon; Leroy (2004) e Okolie et al (2015).

3.1 AMOSTRAGEM

A amostragem foi feita nas grandes redes de supermercados do Rio de Janeiro. Isto é, redes que possuem filiais espalhadas por diversos bairros da cidade, possuem elevada receita anual e atingem o grande público através de preços acessíveis e/ou variedade de produtos. As filiais de tais redes foram escolhidas, principalmente, baseado na facilidade de acesso ao local e facilidade de transporte ao laboratório de análise.

Para que a pesquisa abrangesse um maior número de marcas de queijo Minas frescal e não necessariamente um n elevado, optou-se por escolher amostragem indicativa de acordo com a RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

As condições higiênico-sanitárias do balcão foram levadas em consideração no momento da coleta. Alguns aspectos foram observados, tais como: o uso do balcão somente para o armazenamento de alimentos da categoria “frios” ou “lactínicos”, boas práticas do manipulador responsável pelo setor, limpeza, odor e refrigeração a temperatura máxima de 8°C, como é recomendada pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, nas embalagens de todos os queijos Minas

frescal. A temperatura do balcão foi aferida através de termômetro infravermelho em triplicata. Nenhum dos locais visitados apresentou não conformidades nos itens citados ou inadequações na temperatura.

Foram coletados somente queijos produzidos industrialmente e com Selo de Inspeção Federal ou Estadual, pesando no mínimo 200 g. Deveriam conter a descrição: “queijo Minas tipo frescal com sal”, sem alegação de qualquer direcionamento como: *light*, *diet* ou orgânico. Os queijos foram coletados em suas embalagens originais e íntegras. Como o prazo de validade do queijo Minas é de em média 1 mês, todas as amostras coletadas estavam em média 15 dias da data de vencimento.

A coleta foi feita no período de março a abril de 2016. No total, foram analisadas 10 marcas diferentes de queijo Minas frescal, sendo 1 lote de cada marca, coletados em 6 filiais de 6 grandes redes de supermercados do Rio de Janeiro. Todos os queijos foram coletados no turno da tarde. As amostras foram transportadas em recipiente térmico para o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

3.2 MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA E RECONSTITUIÇÃO DAS AMPOLAS

As cepas de referência utilizadas estão descritas na tabela 4.

Tabela 4

Microrganismos de referências, fonte fornecedora, depósito proveniente e característica genética.

<i>Microrganismos de Referência</i>	Código fornecedor ^a	Código depósito ^b	Características
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00285	ATCC 13565	sea +
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00285	ATCC 14458	seb +, tsst +
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00080	ATCC 19095	sec +

^aINCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

^bATCC, American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA).

Tabela 4 (continuação)

Microrganismos de referências, fonte fornecedora, depósito proveniente e característica genética.			
<i>Microrganismos de Referência</i>	Código fornecedor ^a	Código depósito ^b	Características
<i>Staphylococcus sp.</i>	INCQS 00102	ATCC 23235	sed +, <i>tstag</i> +
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00015	ATCC 25923	Coagulase positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00306	ATCC 33591	<i>mecA</i> +
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	INCQS 00016	ATCC 12228	Coagulase negativa

^aINCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

^bATCC, American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA).

Nas PCR foram utilizados controles negativos de água destilada estéril em cada bateria de teste.

As ampolas dos microrganismos de referências provenientes do Laboratório de Microrganismos de Referência do INCQS, foram reconstituídas com base no POP do INCQS nº 65.3240.025 de “Procedimento para abertura de ampolas e manutenção de micro-organismos de referência do setor de alimentos”.

Reconstitui-se as ampolas (microrganismo liofilizado) com caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (ANEXO C), e uma alíquota foi transferida para um tubo contendo o mesmo caldo. Os tubos foram incubados por 18-24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Para verificar a pureza, foi feita coloração de Gram onde foram observados somente cocos gram positivos. Foi também feita a semeadura em placa com Trypticaseína de soja (TSA) (ANEXO C) e uma colônia isolada e semeada em ágar nutriente inclinado. Após a incubação por 48 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ as cepas foram estocadas a $2-5^\circ\text{C}$ por um mês e foram feitos estoques adicionais em BHI com glicerol a 20% para congelamento a -70°C .

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os queijos passaram por desintegração (mistura do soro com o queijo) de forma manual devido à consistência firme. Esse processo consistia em manusear e pressionar o queijo dentro de sua embalagem original, até que se tornasse uma massa maleável e uniforme (APÊNDICE A).

Eles então foram desembalados e 25 g, representativos do todo, pesados

aspticamente e transferidos para recipiente contendo 225 ml de solução salina a 0,85%. A homogeneização com a salina foi feita por pelo menos 2 min ou até que a maior parte do queijo estivesse na forma semi-líquida. A partir dessa diluição, a diluição 10^{-1} , 1 ml foi transferido para 9 ml de tampão para se obter a diluição 10^{-2} . E assim, sucessivamente, até a diluição 10^{-3} .

3.4 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE ESTAFILOCOCOS DE ACORDO COM APHA E FDA (BENNETT; HAIT; TALLENT, 2015; BENNETT; LANCETTE, 1998)

Foi feito plaqueamento em profundidade em Baird Parker (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) suplementado com fibrinogênio e plasma de coelho (Kasvi, Roseto, Itália) – BPA-RPF (ANEXO C).

O suplemento RPF foi adquirido na forma liofilizada. Após a hidratação do RPF com 10 ml de água purificada e esterilizada foi realizada a homogeneização. A mistura foi adicionada a um frasco contendo 90 ml de ágar base Baird Parker líquido (derretido) a temperatura média de 45°C. Para a diluição 10^{-1} , foram distribuídos 0,3 ml no fundo de 2 placas de Petri estéreis e 0,4 ml em 1 placa. Para a diluição 10^{-2} foram distribuídos os mesmos volumes por placa. O meio de cultura foi então vertido em cada placa até chegar a um volume aproximado de 20 ml e em seguida foi homogeneizado. As placas foram incubadas a 35 °C por 45-48h.

No BPA-RPF, de acordo com o fabricante do ágar base Baird Parker, os ECP formam colônias pretas a cinzas, pequenas, cercadas por um halo de precipitação indicando atividade da coagulase, além de serem cercados por uma zona translúcida. Outros estafilococos crescem como colônias pretas a cinzas, pequenas com a zona translúcida de precipitação do telurito. Colônias de outras bactérias como *Proteus*, crescem espalhadas e amarronzadas.

Das mesmas amostras, foi feito o plaqueamento em superfície em ágar Manitol Salgado (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) – MSA (ANEXO C)

Para a diluição 10^{-1} , foram distribuídos 0,3 ml na superfície de 2 placas de Petri estéreis e 0,4 ml em 1 placa. Para a diluição 10^{-2} foram distribuídos os mesmos volumes. O inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de *Drigaslky*. As placas foram incubadas a 35 °C por 45-48h.

No MSA, as colônias de típicas de *Staphylococcus aureus* produzem a

colônias amareladas cercadas por zonas amarelas. ECN não fermentadores de manitol, produzem colônias rosadas a vermelhas, cercadas por zonas roxo-avermelhadas.

Após o período de incubação de ambos os meios de cultura, foram selecionadas as placas com crescimento de 20 a 200 colônias para contagem com auxílio do contador de colônias. No mínimo, 5 colônias típicas para ECP e 5 colônias selecionadas como ECN e transferidas para placa de TSA, incubadas *overnight* e transferidas para caldo BHI com 20% glicerol em duplicata. Todas as colônias selecionadas foram descritas em caderno de campo para acompanhamentos futuros.

Para a contagem final de ECP *S. aureus* em UFC/g foi feito o cálculo baseado do percentual de colônias típicas isoladas e confirmadas em PCR pela presença de gene espécie-específico para *S. aureus* (*spa*).

Como controles positivos foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA das cepas selecionadas foi feita através de Kit *Genomic DNA from tissue da NucleoSpin® Tissue* (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) seguindo o protocolo do fabricante para extração de DNA de bactérias Gram positivas. Os procedimentos aqui demonstrados foram baseados na seção do manual de procedimento para a purificação de DNA de bactérias do kit

Pelo menos 1 ml de cada cepa enriquecida por 18 horas em caldo BHI passou por centrifugação (Solab, Brasil) por 5 min a 8000 x g e foi descartado o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 180 µl de solução de lise para bactérias Gram Positivas (ANEXO C) e incubou-se os isolados a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado 25 µl de Proteinase K a 22,4 mg/ml e incubou-se a 56°C por 1 h, homogeneizando microtubos a cada 20 minutos. Adicionou-se 20 µl de RNAase a 10 mg/ml e 200 µl de tampão B3 (ANEXO C) (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) para em seguida, incubar novamente, dessa vez a 70°C por 10 minutos. Após a lise final com 210 µl de etanol a 98%, cada cepa foi transferida do microtubo para uma Coluna de Filtração do kit NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) com um tubo coletor e seguiu para

centrifugação por 1 min a 11000 x g, descartando o sobrenadante. Em seguida seguiram-se as etapas de lavagem, primeiramente adicionando 500 µl de tampão BW (ANEXO C) (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) e centrifugação a 1 min a 11000 x g, descartando o filtrado. Segundo etapa de lavagem foi feita pela adição de 600 µl de tampão B5 (ANEXO C) (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) e centrifugando por 1 min a 11000 x g.

Na etapa de finalização e eluição, a Coluna de Filtração NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) foi transferida para um novo microtubo, para que ocorra a adição de 100 µl de tampão BE (ANEXO C) (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) (pré-aquecido a 70°C) e centrifugação final por 1 min a 11000 x g. Após essa etapa, o filtro foi descartado e cada filtrado (DNA extraído) foi estocado a -20°C.

3.6 RECONSTITUIÇÃO DE PRIMERS

Os *primers* ou iniciadores foram adquiridos dos fornecedores pela *Eurofins Genomic* (Ebersberg, Alemanha) e pela *Invitrogen Thermo Fisher Scientific* (Califórnia, EUA) na forma de oligonucleotídeos desidratados. Para a reconstituição foi estabelecida a concentração final de 100 µM. A ressuspensão foi feita com solução de TrisHCl-EDTA (ANEXO C). De acordo com o número de mol de cada *primer* foi adicionado determinado volume de TE para chegar a concentração final de 100 µM.

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As cepas selecionadas e repicadas foram analisadas através um protocolo de PCR uniplex e três protocolos de PCR - *Multiplex* para detectar genes que codificam gene *tuf* do gênero *Staphylococcus sp. (tstag)*, EEA, EEB, EEC, EED, TSST, PVL, ETA, ETB, além do gene *tuf* para espécies coagulase negativa (*cns*) e a resistência a metilina. As sequências de nucleotídeos dos *primers* que serão utilizados para cada gene estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5

Sequência de nucleotídeos, tamanho dos amplicon e referências.

Gene	Sequência de nucleotídeos do <i>Primer</i> (5' e 3')	Amplicon (bp*)	Referência
<i>tstag422</i>	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA	370	Martineau et al (2001)
<i>tstag765</i>	TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA		
<i>cns-1</i>	TATCCACGAAACTTCTAAAACAAGTGTACT	204	Okolie et al (2015)
<i>cns-2</i>	TCTTTAGATAATACGTATACTTCAGCTTTGAATTT		
<i>mecA-1</i>	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	155	Nakagawa et al (2005)
<i>mecA-2</i>	CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC		
<i>lukS- PV</i>	TTACACAGTTAAATATGAAGTGAAGTGGGA	118	Nakagawa et al (2005)
<i>lukF- PV</i>	AGCAAAAGCAATGCAATTGATG		
<i>spa-1</i>	CAGCAAACCATGCAGATGCTA	101	Nakagawa et al (2005)
<i>spa-2</i>	CGCTAATGATAATCCACCAAATACA		
<i>sea1</i>	TTGGAA ACGGTTAAA ACGAA	120	Johnson et al (1991)
<i>sea2</i>	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb1</i>	TCGCATCAAAGTACAAACG	478	Johnson et al (1991)
<i>seb2</i>	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec1</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	Johnson et al (1991)
<i>sec2</i>	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed1</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	Johnson et al (1991)
<i>sed2</i>	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>eta F</i>	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	190	Wu et al (2011)
<i>eta R</i>	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC		
<i>etb F</i>	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612	Jarraud et al (2000)
<i>etb R</i>	AGTGAAGTATCTTTCTATTGAAAAACACTC		
<i>etd F</i>	CAAAGTATCATGTATCAAGGATGG	358	Wu et al (2011)
<i>etd R</i>	CCAGAATTTCCCGACTCAG		
<i>staph756F</i>	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA	756	Zhang et al (2004)
<i>staph750R</i>	CCACCTTCTCCGGTTTGTACC		

* bp: pares de bases

Foram utilizados tampão reacional (Invitrogen, Califórnia, EUA), DNTP (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil), MgCl₂ (Invitrogen, Califórnia, EUA), Taq Polimerase (Invitrogen, Califórnia, EUA) para todas as reações, que ocorreram em termociclador (Life Eco, Bioer Technologies, Binjiang, China). Todos os produtos foram estocados a -20°C.

3.7.1 Protocolo para amplificação de genes para o gênero *Staphylococcus sp.* (*Tstag*)(MOROT-BIZOT; TALON; LEROY, 2004)

As reações foram feitas com um volume reacional de 25 µl, sendo 3 µl de DNA *template*, contendo: 0,2 µM de cada par de iniciadores *tstag*, 200 µM de cada DNTP, 3 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA-polimerase em tampão de PCR diluído 1X. O restante do volume foi corrigido com água destilada estéril.

A PCR seguiu as seguintes condições: 15 min a 4°C, 3 min a 94°C, 40 ciclos de 1 s a 95°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C e uma extensão final de 3 min a 72°C.

3.7.2 Protocolo para amplificação de genes de espécies coagulase negativa, *S. aureus*, PVL e resistência a meticilina (OKOLIE et al, 2015).

O mix da PCR com volume de 40 µl continha: 0,5 mM de DNTPs, 10 U de Taq DNA-polimerase e tampão de PCR diluído 1X. 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM do iniciador *cns* e 0,75 µM dos demais pares de iniciadores *spa*, *lks-PV* e *mecA* e 5 µl de DNA *template*. O restante do volume foi corrigido com água destilada estéril.

As condições aplicadas foram: 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos consistindo de 15 s a 94°C e 5 s a 60°C além de uma extensão final de 30 s a 72°C.

Seguiram para a pesquisa de genes de virulência somente as cepas de estafilococos que foram positivas para os genes *cns* ou *spa*. Cepas positivas somente para gênero *Staphylococcus sp.* não seguiram para as outras análises, mas foram consideradas no cálculo da contagem em placa de ECN.

3.7.3 Protocolo para amplificação de genes de toxinas esfoliativas (INDRAWATTANA et al, 2013).

O mix da PCR, num volume de 25 µl, continha: 1 µM de cada primer (*eta*, *etb*, *etd*), 0,12 µM do primer Staph756, 2 mM de MgCl₂, 1 U de Taq-DNA Polimerase, 500 µM de mix de DNTP, tampão de PCR diluído 1X e 2 µl de DNA *template*. O restante do volume foi corrigido com água destilada estéril.

A reação foi submetida as seguintes condições: 10min a 95°C, 35 ciclos de 30

s a 95°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C, seguido de extensão final de 10 min a 72°C.

3.7.4 Protocolo para amplificação de genes de EEA, EEB, EEC e EED (Da CUNHA et al, 2006).

O volume reacional foi de 25 µl, sendo 0,8 µM de cada primer (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*), 0,75 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA-Polimerase, 200 µM de mix de DNTP, tampão de PCR diluído 1X e 2 µl de DNA *template*.

O protocolo seguiu as condições: 4 min a 94°C for, 1 ciclo de 2 min a 94°C for, 1 min e 30 s a 55°C e 1 min e 30 s a 72°C, 1 ciclo de 2 min a 94°C, 1 min e 30 s a 53°C e 1 min e 30 s a 72°C. Mais 1 ciclo de 2 min a 94°C, 1 min e 30 s a 51°C e 1 min e 30 s a 72°C seguido de 37 ciclos de 2 min a 94°C, 1 min e 30 s a 51°C e 1 min e 30 s a 72°C e extensão final de 7 min a 72°C.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Os produtos foram lidos em cuba de eletroforese com variadas concentrações de gel de agarose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), de acordo com cada protocolo, mergulhado em tampão Tris-borato-EDTA (Molecular Biology Grade) concentrado 1x.

Cada produto de PCR foi corado com *Blue-Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e comparado a marcador de peso molecular de 1 Kb ou 100 bp (Invitrogen, Califórnia, EUA).

O resultado foi visualizado em transiluminador de luz UV (Forlab, Rio Grande do Sul, Brasil) e fotografado por fotodocumentador (LabTrade, São Paulo, Brasil).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAGEM E CARACTERÍSTICAS

Com relação às embalagens, de 10 amostras, 7 (70%) estavam embaladas em sacos plásticos lacrados com artefato metálico. Duas (Q5 e Q6) estavam embaladas em plástico lacrado a vácuo. Somente uma (Q1) estava embalada em saco plástico lacrado dentro de pote plástico com tampa, revestido com filme de PVC.

Todos os queijos tinham composição semelhante a base de leite pasteurizado, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, ácido láctico e coalho sendo que 70% são de marcas com sede em Minas Gerais, 20% no Rio de Janeiro e 10% no Espírito Santo (Tabela 6).

Tabela 6

Número de queijos, estado produtor, data e supermercado da coleta.			
Queijo	Estado	Data da coleta	Local
Q1	Minas Gerais	22/02/16	L1
Q2	Rio de Janeiro	07/03/16	L2
Q3	Rio de Janeiro	07/03/16	L3
Q4	Minas Gerais	14/03/16	L4
Q5	Espírito Santo	21/03/16	L5
Q6	Minas Gerais	21/03/16	L6
Q7	Minas Gerais	28/03/16	L1
Q8	Minas Gerais	28/03/16	L2
Q9	Minas Gerais	04/04/16	L3
Q10	Minas Gerais	04/04/16	L4

4.2 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS EM BPA-RPF E MSA E CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A RDC nº 12 (BRASIL, 2001)

Todas as amostras apresentaram algum crescimento microbiano no BPA-RPF e MSA. No entanto, a contagem em placas nos dois meios de cultura foi variável, indo de valor estimado em $\log 1$ UFC/g até $\log 6$ UFC/g. Mas a média de crescimento ECP, $\log 3,23$ UFC/g e $\log 3,71$ UFC/g, em BPA-RPF e MSA, respectivamente, e a média de crescimento ECN $\log 5,48$ UFC/g e $\log 5,49$ UFC/g

em BPA-RPF e MSA, respectivamente, foram muito semelhantes.

Foram selecionadas 75 colônias típicas e 74 atípicas de BPA-RPF, e 60 típicas e 57 atípicas de MSA. A amostra Q7 teve maior número de repicados totais (28) em BPA-RPF, e Q4 em MSA, pois, além de suas elevadas contagem em placa, cresceram colônias com características morfológicas distintas e de interesse para identificação (Tabela 7). No total 117 cepas de MSA e 149 cepas de BPA-RPF foram repicadas e estocadas. As 266 cepas seguiram para a caracterização através dos protocolos de PCR Uni e *Multiplex* baseado em Morot-Bizot; Talon e Leroy (2004) e em Okolie et al (2015), respectivamente, e os resultados serviram de base para contagem de ECP e ECN em placa.

Tabela 7

Colônias repicadas a partir de BPA-RPF e MSA

Amostra	BPA-RPF		MSA		TOTAL
	Típicas ^a ECP	Atípicas ^b	Típicas ^a ECP	Atípicas ^b	
Q1	11	8	13	8	40
Q2	0	3	1	3	7
Q3	3	2	4	2	11
Q4	12	10	21	12	55
Q5	8	10	2	5	25
Q6	5	8	5	5	23
Q7	11	17	5	6	39
Q8	12	6	0	9	27
Q9	6	5	5	5	21
Q10	7	5	4	2	18
TOTAL	75	74	60	57	266

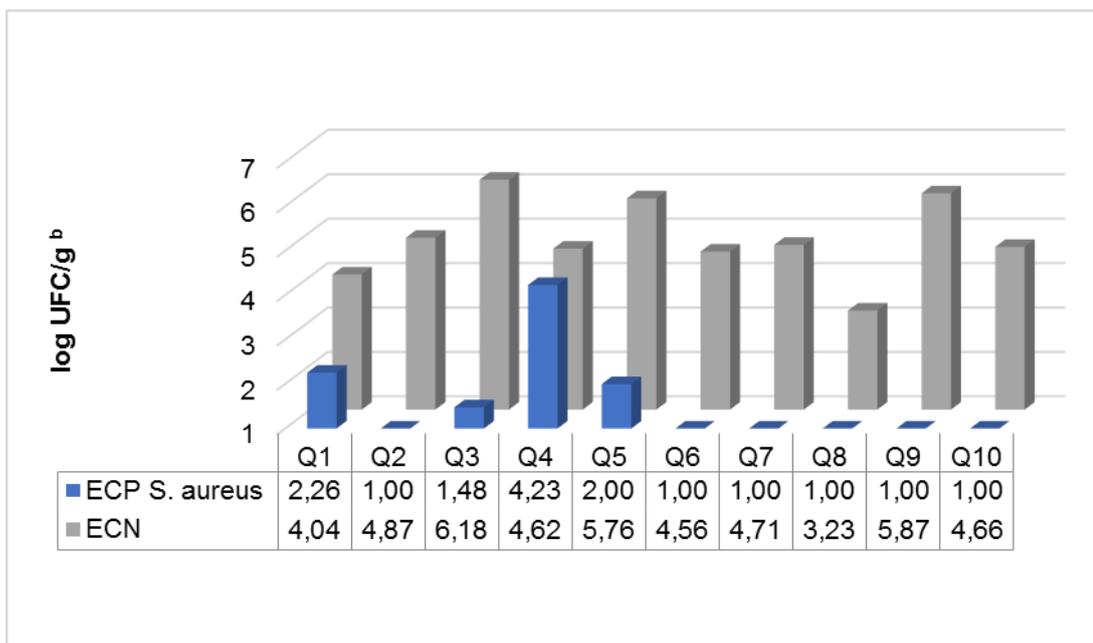
^a Colônias com características típicas para ECP. ^b Colônias com características para ECN.

Os gráficos 1 e 2 apresentam a contagem de cada amostra em BPA-RPF e MSA, respectivamente, subdividida em contagem ECN e contagem ECP-*S.aureus* em log UFC/g.

Durante a desintegração do Q3, foi observada a presença de um corpo estranho pequeno. Não foi possível fazer a identificação do elemento, mas ele foi selecionado para a pesagem dos 25 g para a análise microbiológica (APÊNDICE B). A maior contagem em BPA-RPF, considerando a contagem para ECN e para *S. aureus*, de forma isolada, foi da amostra Q3 que totalizou log 6,17 UFC/g de ECN. Na enumeração em MSA, essa amostra obteve contagem de ECN bem menor (log 3,78 UFC/g).

Na maior parte (60%) das amostras não houve crescimento de ECP tanto em BPA-RPF quanto em MSA. Essas, tiveram contagem de ECP estimada em $< \log 1$ UFC/g, já que nenhuma das colônias típicas repicadas foram confirmadas como *S. aureus* pela análise molecular. Quatro amostras (Q2, Q6, Q7 e Q8) obtiveram contagem de ECP estimada em $< 1 \log$ UCF/g em ambos os meios de cultura. Porém, as demais amostras com esse padrão, obtiveram resultados distintos em cada meio. Enquanto em MSA, a amostra Q10 obteve contagem de ECP de $\log 4,65$ UFC/g, em BPA-RPF, essa mesma amostra obteve o padrão estimado em crescimento mínimo. O mesmo ocorreu com a amostra Q4, que em BPA-RPF obteve $\log 4,23$ UFC/g de ECP, e em MSA a contagem foi estimada em $< 1 \log$ UFC/g (Gráfico 2). Vale ressaltar que a contagem de Q10 para ECP foi a mais elevada de todas as amostras em ambos os meios.

Gráfico 1 - Contagem em placa em BPA-RPF de ECN e ECP *S. aureus* por amostra de queijo ^a.

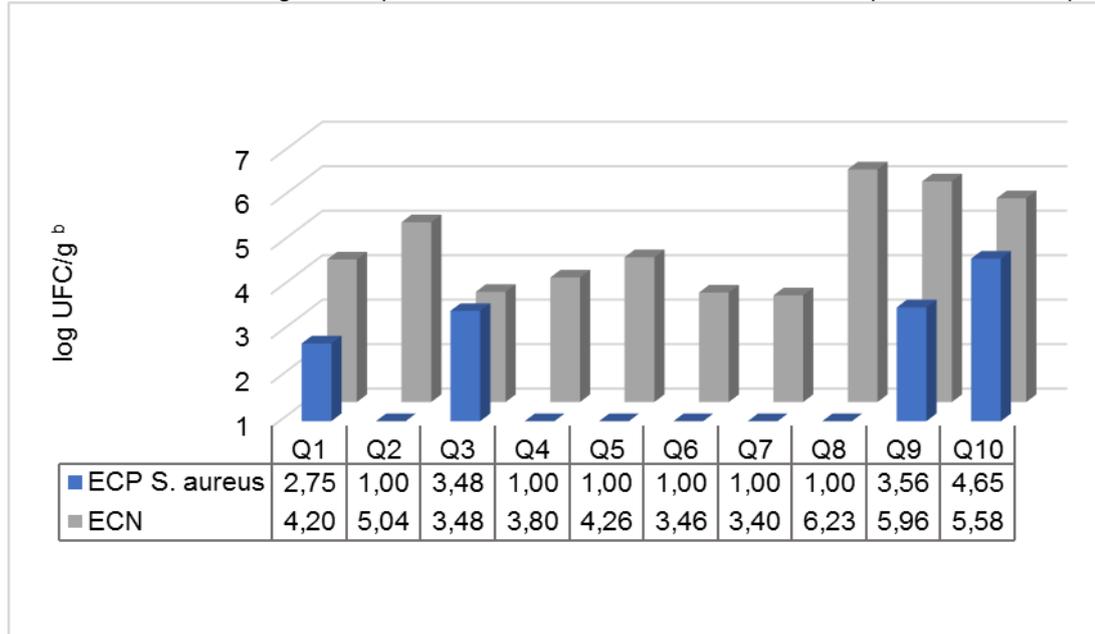


^a Valores de “ $\log 1$ UFC/g”, foram valores estimados a partir da não confirmação de nenhuma colônia típica como *S. aureus*. O BAM determina que, nestes casos, a contagem deve ser estimada em $\leq \log 1$ UFC/g. ^b A leitura do eixo y inicia-se no valor 1 pois o crescimento mínimo é sempre estimado em valores $\leq \log 1$ UFC/g.

Todas as amostras obtiveram algum crescimento de colônias ECN. Em BPA-RPF, todas as amostras obtiveram contagem superior a $\log 3$ UFC/g, chegando a $\log 6,18$ UFC/g. O padrão em MSA foi semelhante variando de $\log 3,40$ UFC/g até $\log 6,23$ UFC/g.

A amostra com maior contagem total de ECN foi a Q8, chegando a log 6,23 UFC/g, em MSA. Essa amostra em BPA-RPF obteve a menor contagem de ECN (log 3,23 UFC/g). Mesmo sem crescimento de colônias com características típicas para ECP em MSA, em BPA-RPF cresceram 39 colônias típicas e 12 foram selecionadas para caracterização por PCR, sendo 10 confirmadas na amostra Q8.

Gráfico 2 - Gráfico da contagem em placa em MSA de ECN e ECP *S. aureus* por amostra de queijo ^a.



^a Valores de “ log 1 UFC/g “, foram valores estimados a partir da não confirmação de nenhuma colônia típica como *S. aureus*. O BAM determina que, nestes casos, a contagem deve ser estimada em \leq log 1 UFC/g. ^b A leitura do eixo y inicia-se no valor 1 pois o crescimento mínimo é sempre estimado em valores \leq log 1 UFC/g.

De acordo com os critérios estabelecidos pela RDC nº12 (BRASIL, 2001), a maioria das amostras estava em conformidade a legislação brasileira em ambos os meios. Em BPA-RPF 90%, e em MSA 60% das amostras estavam com a contagem em placa para ECP menor do que log 2,69 UFC/g, o padrão máximo tolerável para amostras indicativas (Tabela 8). Somente uma amostra (Q4) em BPA-RPF apresentou contagem acima de log 2,69 UFC/g, chegando a log 4,23 UFC/g. As amostras em MSA (40%), que se encontravam acima do limite tolerável, variaram a contagem entre log 2,75 UFC/g (Q1) e log 4,65 UCF/g (Q10). Enfatiza-se que a amostra Q1 atingiu contagem limítrofe ao critério máximo tolerável para ECP (log 2,75 UFC/g).

Diante dos resultados classificatórios de acordo com a RDC nº12, cinco amostras apresentaram classificações opostas em cada meio. A alternância de

classificação em “*de acordo com os padrões legais vigentes*” em BPA-RPF para “*impróprio para o consumo humano*” em MSA ocorreu em 4 amostras (Q1, Q2, Q9 e Q10). O contrário, isto é, alternância de “*impróprio para o consumo humano*” em BPA-RPF para “*de acordo com os padrões legais vigentes*” em MSA ocorreu somente em uma amostra (Q4). As demais amostras (50%) foram classificadas de maneira igualitária em ambos os meios.

Tabela 8

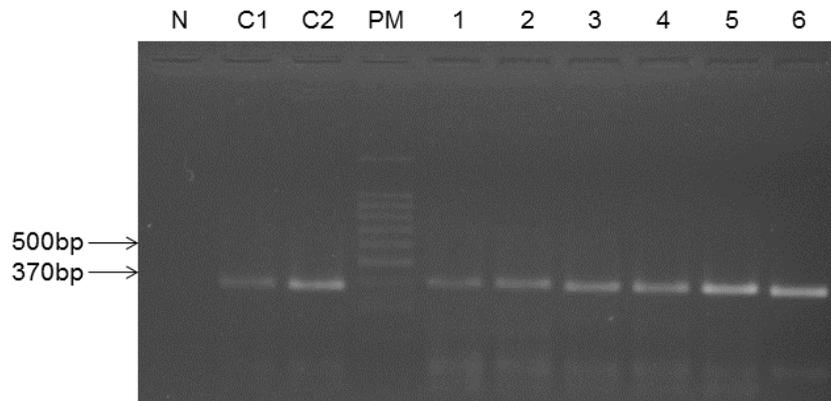
Classificação das amostras segundo a contagem de ECP de acordo com a RDC nº12 (BRASIL, 2001)

Amostra	BPA-RPF	MSA
Q1	De acordo com os padrões legais vigentes	Impróprio para o consumo humano
Q2	De acordo com os padrões legais vigentes	De acordo com os padrões legais vigentes
Q3	De acordo com os padrões legais vigentes	Impróprio para o consumo humano
Q4	Impróprio para o consumo humano	De acordo com os padrões legais vigentes
Q5	De acordo com os padrões legais vigentes	De acordo com os padrões legais vigentes
Q6	De acordo com os padrões legais vigentes	De acordo com os padrões legais vigentes
Q7	De acordo com os padrões legais vigentes	De acordo com os padrões legais vigentes
Q8	De acordo com os padrões legais vigentes	De acordo com os padrões legais vigentes
Q9	De acordo com os padrões legais vigentes	Impróprio para o consumo humano
Q10	De acordo com os padrões legais vigentes	Impróprio para o consumo humano

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS

Das colônias selecionadas em placa, 91% foram confirmadas como sendo do gênero *Staphylococcus* sp. (242/266) através da amplificação do gene *tstag-422* (370 bp) (Figura 2). As cepas negativas (36/266) foram retestadas para amplificação do gene *cns* e 12 (33,3%) foram positivas para ECN. Vinte por cento (53/266) dos isolados não amplificaram gene para *cns*, nem para *spa*, mas amplificaram o gene *tstag-422*. Dos isolados considerados estafilococos, 140 eram ECN (*cns*) e 32 eram *S. aureus* (*spa*). O MSA foi o meio de cultura que mais teve crescimento de cepas de outros gêneros que não o *Staphylococcus* sp., representando 14,5% das cepas isoladas partir dele (Tabela 9).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para amplificação do gene *tstag442* (370 bp).



N= controle negativo água purificada estéril; C1: *S. aureus* ATCC 25923; C2= *S. epidermidis* ATCC 12228; PM=peso molecular Invitrogen 100bp; Poços 1-6: isolados de amostras de queijo Minas frescal.

Tabela 9

Colônias isoladas a partir de cada meio de cultura

Tipo de colônia (n)	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>S. aureus (spa+)</i>	Espécies coagulase negativa (cns+)	<i>Staphylococcus spp</i> não identificados com <i>cns</i> ou <i>spa (tstag +)</i>	Outros gêneros
Típicas ^a ECP em BPA-RPF (75)	72 (96%)	18 (24%)	47(62,7%)	7 (9,3%)	3 (4%)
Atípicas ^b em BPA-RPF (74)	70 (94,6%)	2 (2,7%)	58 (78,4%)	11 (14,8%)	4 (5,4%)
Colônias totais em BPA-RPF (149)	142 (95,3%)	20 (13,4%)	105 (70,5%)	17 (11,4%)	7 (4,7%)
Típicas ^a ECP em MSA (60)	47 (78,4%)	12 (20%)	21 (35%)	10 (16,7%)	13 (21,7%)
Atípicas ^b em MSA (57)	53 (92,9%)	-	14 (24,5%)	26 (45,6%)	4 (7%)
Colônias totais em MSA (117)	100 (85,7%)	12 (10,3%)	35 (59,8%)	36 (45,3%)	17 (14,5%)

^a Colônias com características típicas para ECP. ^b Colônias com características para ECN.

Com relação à associação de características morfo-fenotípicas as genotípicas, os meios mostraram semelhanças. Das colônias contabilizadas como típicas em cada meio de cultura, 24% eram *S. aureus* em BPA-RPF e 20% eram *S. aureus* em MSA. No caso das colônias atípicas, o percentual confirmado com o gene *spa* foi baix: 2,7% em BPA- RPF e nenhuma em MSA, respectivamente.

Do meio BPA-RPF foram isolados 20 (7,5%) *S. aureus* e 105 (39,5%) ECN, do

MSA foram isolados 12 (4,5%) *S. aureus* e 35 (13,2%) ECN (Gráficos 3 e 4). Analisando o número total de isolados (266), a proporção de cepas provenientes de cada meio foi semelhante (56% de BPA-RPF e 43,8% de MSA). Mas a maior parte dos isolados ECN (75,0%) foi proveniente do BPA-RPF (105/140).

Gráfico 3- Proporção de isolados ECN provenientes dos meios MSA e BPA-RPF em relação ao número total colônias selecionadas (n=266).

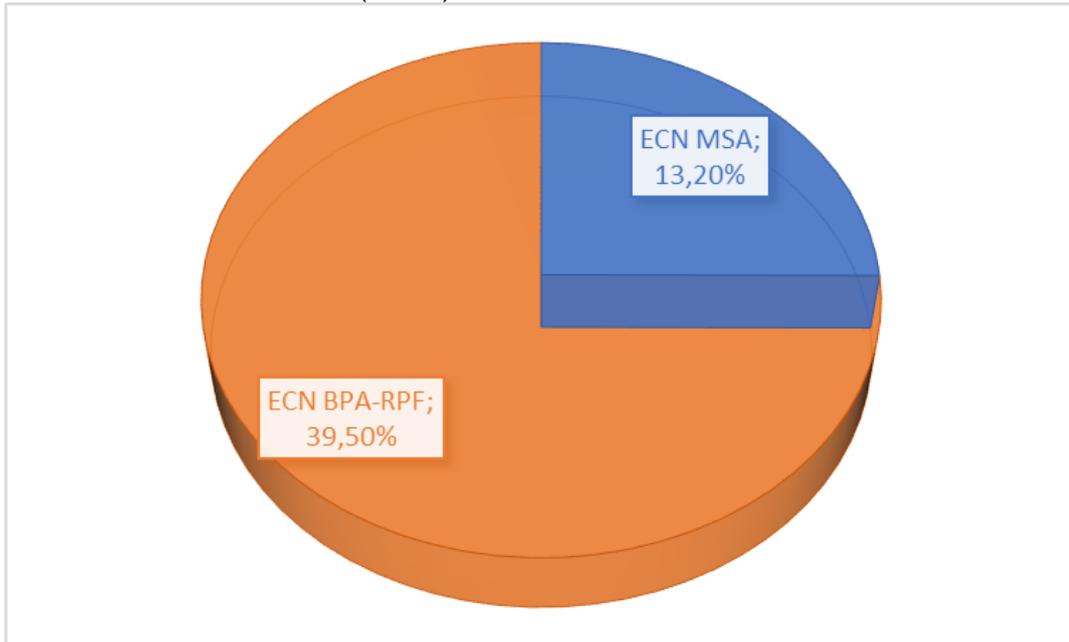
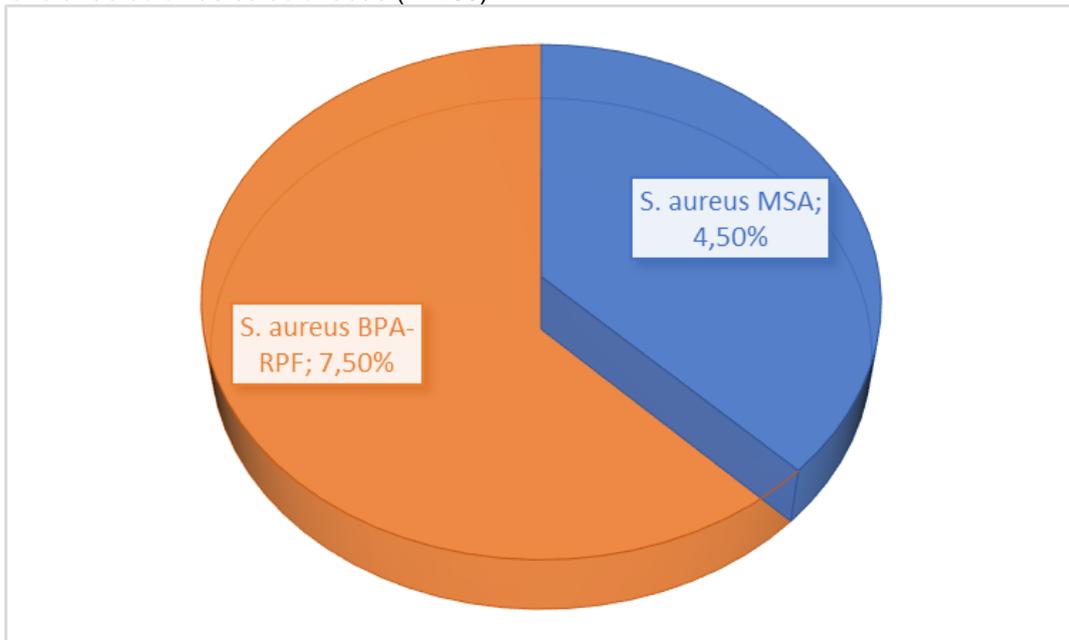


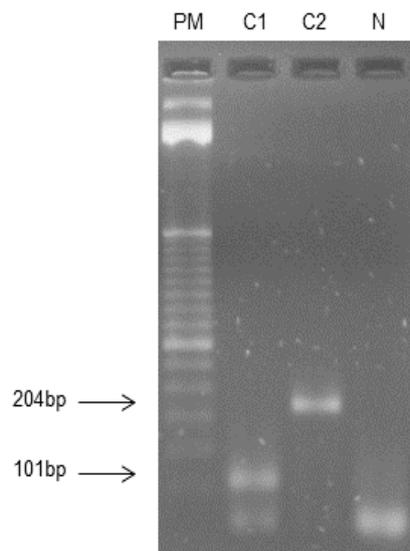
Gráfico 4 - Proporção de isolados *S. aureus* provenientes dos meios MSA e BPA-RPF em relação ao número total de colônias selecionadas (n=266).



4.4 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA

De 266 isolados, 172 seguiram para pesquisa de virulência através de 2 protocolos de PCR multiplex. Desses, 140 amplificaram o gene *cns* (204 bp) e 32 o gene para *S. aureus* (101 bp) (Figura 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para amplificação dos genes *cns* (204 bp) e *spa* (101 bp).



N= controle negativo água purificada estéril; C1: *S. aureus* ATCC 25923; C2= *S. epidermidis* ATCC 12228; PM=marcador de peso molecular.

A maioria das amostras (90%) apresentou pelo menos uma cepa com gene de virulência amplificado. Apenas Q2 não amplificou nenhum gene de virulência em seus isolados analisado (0/3). A partir do MSA foi isolado somente um *S. aureus* com fator de virulência, enquanto, os demais foram isolados de BPA-RPF. Sendo que 50% (4/8) foram isolados a partir da amostra Q4 em BPA-RPF. Mas ressalta-se que não foi isolado *S. aureus* com genótipo de virulência da maior parte das amostras (60%)

A maior parte dos isolados ECN com genótipo de virulência (33/42) foi isolada a partir do BPA-RPF, assim como ocorreu nos isolados *S. aureus* com genótipo de virulência. O percentual de isolados ECN com perfil virulento em MSA e BPA-RPF nas amostras, variou de 75% (Q1 em BPA) a 7,7% (Q7 em BPA). Nenhum dos isolados ECN da amostra Q9 apresentaram genes positivos para virulência (Tabela 10).

A amostra com o maior percentual de isolados positivos para genes de toxinas foi Q4. Nela, 70,4% dos seus isolados ECN e 100% dos seus isolados *S. aureus* apresentaram perfil com algum gene de virulência.

Tabela 10
Distribuição de isolados *S. aureus* e ECN por amostra.

Amostras	Número de isolados <i>S. aureus</i>		Número de isolados ECN		Número de <i>S. aureus</i> com genótipo de virulência ^a		Número de ECN com genótipo de virulência ^a	
	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA
Q1	9	6	4	10	-	-	3 (75%)	-
Q2	-	1	1	1	-	-	-	-
Q3	3	2	2	2	-	-	-	1 (50%)
Q4	4	-	15	12	4 (100%)	-	12 (80%)	7 (58,3%)
Q5	1	-	14	-	1 (100%)	-	4 (28,6%)	-
Q6	-	-	13	-	-	-	7 (53,8%)	-
Q7	-	-	26	3	-	-	2 (7,7%)	1 (33,3%)
Q8	-	-	14	5	-	-	3 (21,4%)	-
Q9	2	3	7	1	2 (100%)	-	-	-
Q10	-	1	9	1	-	1 (100%)	2 (22,2%)	-
TOTAL	19	13	105	35	7 (36,8%)	1 (7,7%)	33 (31,4%)	9 (25,7%)
	32		140		8		42	

- : não detectável

^aEm parênteses estão os valores percentuais referentes ao número de isolados (ECN ou *S. aureus*) de cada meio de cultura (BPA-RPF ou MSA) por amostra (Q1 – Q10) ou referente ao número total de isolados (ECN+*S. aureus*) (n=172).

Das cepas previamente identificadas como *S. aureus*, 25% (8/32) apresentaram genes para EE ou TE. A proporção de isolados *S. aureus* e ECN positivos somente para genes de TE foi semelhante. Enquanto 12,5% do *S. aureus* foram positivos para genes de TE, 13,9% dos ECN foram positivos para esse mesmo tipo de toxina.

A maior parte dos genes de virulência encontrados fora provenientes de isolados ECN (22/61) da amostra Q4, seguido de *S. aureus* isolados dessa mesma amostra (12/61). (Tabela 11). A partir do BPA-RPF foi isolado o maior percentual de cepas com genótipo positivo para o gene *eta* (31,1%), enquanto a partir de MSA o percentual de isolados com esse genótipo foi baixo (8,2%). Ainda sobre MSA, pode-se afirmar que 4 isolados *S. aureus* com genes de virulência foram isolados desse meio, e nenhuma cepa com gene para *etb* foi proveniente de MSA.

Tabela 11 (Parte I)

Genes de virulência amplificados por amostra e por meio de cultura ^{a, b}

Amostra	Bactéria	<i>eta</i>		<i>etb</i>		<i>etd</i>		<i>seb</i>		<i>sed</i>		TOTAL genes
		BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	
Q1	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	-	1 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,6%)
Q2	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	2 (100%)	-	-	2 (3,3%)
	ECN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q3	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	-	1 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,6%)
Q4	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	7 (58,3%)	3 (25%)	1 (8,3%)	-	1 (8,3%)	-	12 (19,6%)
	ECN	7 (31,8%)	2 (9,1%)	-	-	3 (13,6%)	-	-	1 (4,5%)	5 (22,7%)	4 (18,2%)	22 (36,1%)
Q5	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	-	-	1 (20%)	-	-	-	-	-	4 (80%)	-	5 (8,2%)

- : não detectável

^aEm parênteses estão os valores percentuais referentes ao número de genes nos isolados (ECN ou *S. aureus*) de cada meio de cultura (BPA-RPF ou MSA) por amostra (Q1 – Q10) ou referente ao número total de genes em todos os isolados (ECN+*S. aureus*)(n=61)

^bgenes *sea*, *sec*, *pvl* e *tsst* não foram detectados em nenhuma amostra.

Tabela 11 (Parte II - continuação)

Genes de virulência amplificados por amostra e por meio de cultura ^{a, b}

Amostra	Bactéria	<i>eta</i>		<i>etb</i>		<i>etd</i>		<i>seb</i>		<i>sed</i>		TOTAL genes
		BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	BPA-RPF	MSA	
Q6	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	7 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7 (11,5%)
Q7	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	2 (66,7%)	1 (33,3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (4,9%)
Q8	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ECN	2 (66,7%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (33,3%)	-	3 (4,9%)
Q9	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	2 (100%)	-	-	-	2 (3,3%)
	ECN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q10	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	-	-	1 (1,6%)
	ECN	1 (50%)	-	-	-	-	-	-	-	1(50%)	-	2 (2,3%)
TOTAL		19 (31,1%)	5 (8,2%)	1 (1,6%)	-	10 (16,4%)	3(4,9%)	3(4,9%)	4 (6,6%)	12 (19,7%)	4 (6,6%)	61

- : não detectável

^a Em parênteses estão os valores percentuais referentes ao número de genes nos isolados (ECN ou *S. aureus*) de cada meio de cultura (BPA-RPF ou MSA) por amostra (Q1 – Q10) ou referente ao número total de genes em todos os isolados (ECN+*S. aureus*)(n=61).

^b Genes *sea*, *sec*, *pvl* e *tsst* não foram detectados em nenhuma amostra.

Os genes que codificam as toxinas esfoliativas foram os mais prevalentes (38/61) dentre os genes de virulência pesquisados. Somente duas amostras não carregavam estafilococos com genótipo positivo para TE (Q2 e Q9). A maioria dos genes para virulência encontrada foi proveniente de isolados da amostra Q4.

O *eta* foi o mais amplificado (39,3%), somando a amplificação nos dois meios de cultura, e estava presente no genoma de isolados de 6 amostras. A única cepa carreadora do gene *etb* havia sido identificado como *S. aureus* através do gene *spa* e foi isolada em BPA-RPF.

Dos genes que codificam EE pesquisados, somente *seb* e *sed* foram encontradas nesses isolados. O gene para EE mais prevalente foi o *sed*, representando 26,3% dos genes amplificados. Nenhuma cepa foi positiva para os genes *sea* ou *sec*.

Foram encontrados 10 padrões de combinações de genes de virulência nos isolados (Tabela 12). Dos 172 isolados, 27,9% (48/172) apresentaram pelo menos um gene de virulência (*seb*, *sed*, *eta*, *etb* e/ou *etd*). Algumas cepas, representando 1,7%, mostraram positividade para 3 genes, e 4,1% (7/172) carregavam 2 genes de virulência. Todas essas amostras com mais de um gene de virulência foram provenientes de uma mesma amostra de queijo (Q4). Apenas uma pequena proporção dos *S. aureus* não apresentou genótipo de virulência (13,9%).

Uma cepa de *S. aureus* coamplificou genes que codificam genes que codificam EEB e EED, sendo essa a única amplificação do *sed* nessa espécie. Duas cepas *S. aureus* amplificaram o gene *seb*. No caso das toxinas esfoliativas, 3 cepas de *S. aureus* foram positivas para *etd* e 1 para *etb*.

Isolados com o padrão *cns+eta* foram os mais prevalentes. 42 dos 140 ECN amplificaram genes de virulência. 19 foram provenientes de uma mesma amostra (Q4). Desses, 6 isolados coamplificaram gene para *eta* e *etd*, e 3 isolados amplificaram *eta*, *etd* e *sed*.

Nenhuma cepa carregava o gene *pvl*, nem *tsst*. Tampouco foram encontrados isolados com o genótipo de resistência a metilicina.

Tabela 12

Padrão de genótipos em *Staphylococcus spp.* isolados de queijo Minas frescal (n=172)

Genótipo	Número de isolados	%
<i>spa</i>	24	13,9
<i>cns</i>	97	56,4
<i>cns + seb</i>	4	2,3
<i>cns + sed</i>	13	7,6
<i>cns + eta</i>	15	8,7
<i>cns + etd</i>	2	1,2
<i>cns + eta + etd</i>	6	3,5
<i>spa + etb</i>	1	0,6
<i>spa + etd</i>	3	1,7
<i>spa + seb</i>	3	1,7
<i>spa + seb + sed</i>	1	0,6
<i>cns + eta + etd + sed</i>	3	1,7
Total	172	100

5 DISCUSSÃO

Os guias e normativas brasileiros para análise microbiológica de alimentos recomendam o uso do BPA para a análise de alimentos. Entretanto, para amostras clínicas, a ANVISA recomenda o uso do meio MSA. Essa diferença de recomendação não ocorre no caso dos guias de referências internacionais, portanto o presente estudo utilizou os dois tipos de ágar, afim de levantar possíveis diferenças entre eles.

Durante o uso do suplemento RPF, foram encontradas algumas dificuldades práticas e problemas no preparo do meio. Mesmo seguindo o protocolo e aferindo a temperatura em todas as etapas, o suplemento hidratado, ao ser adicionado ao meio de cultura a 45°C, algumas vezes, formava uma massa sólida (APÊNDICE C). O crescimento bacteriano ficava nitidamente influenciado pela presença do sólido na placa. Essas placas ou foram desconsideradas da contagem em duplicata ou substituídas por outra diluição.

Foi observado que a diferenciação entre colônias consideradas típicas para espécies coagulase positiva e negativa era subjetiva e não estava em completo acordo com o descrito nos manuais do fabricante do BPA-RPF. Colônias típicas com halo plenamente evidente ocorreram de forma minoritária. A comparação com as placas no qual foram inoculados os controles ATTC 25923 e ATCC 12228, levou em consideração a semelhança morfológica e formas de crescimento. Dentre os aspectos analisados de cada colônia tinha-se: tamanho, formato, brilho ou opacidade e crescimento em superfície ou em profundidade. Viçosa et al (2010) avaliaram a permanência de inóculo de ECP em Ágar BP, Ágar RPF e Petrifilm®. O inóculo de 1 ml de log 5 UFC/g (escala de McFarland) foi feito em leite cru e queijo frescal. O resultado mostrou que não foram obtidas diferenças significativas ($P < 0,05$) e que o ágar RPF teve boa correlação com o Petrifilm® com relação à contagem de bactérias.

A maior parte dos isolados foi proveniente do BPA-RPF. Contudo comparativamente ao MSA, esse ágar possuía caracterização muito subjetiva das cepas. Enquanto no meio MSA a morfologia das colônias típicas foi bem

distinta e a mudança de cor do meio devido a fermentação do manitol (APÊNDICE D) foi evidente, no BPA-RPF houve alguns complicadores. Os halos das colônias consideradas típicas, muitas vezes, eram pouco evidentes e/ou se sobrepunham. No caso deste estudo, foi feita a identificação dos isolados, mas para casos de avaliação microbiológica por contagem em placas para fins de pesquisa, essa característica do meio pode implicar em erro na contagem. Santos (2008) comparou BPA-RPF com Petrifilm™ e constatou algumas desvantagens do BPA-RPF como, por exemplo, a reversão dos halos de fibrina sucedida em amostras com carga microbiana elevada. Possivelmente, devido a ação de enzimas produzidas pelos microrganismos acompanhantes e coalescência dos halos quando as colônias se encontravam muito próximas, o que dificulta a enumeração.

No MSA, as colônias típicas e atípicas eram exibidas de forma bem mais evidente e objetiva, quando comparadas ao BPA-RPF. Além disso, ocorreram variações de contagem de uma mesma amostra em cada meio de cultura. Ruaro et al (2013) também utilizou os dois meios de cultura para isolamento de ECN em amostras de leite cru e queijos com leite cru de diferentes animais em Fazendas no norte da Itália. A variação de contagem de ECN nos dois meios foi de log 3 UCF/g a log 4 UFC/g. Neste trabalho a variação foi maior, de log 3,23 UFC/g a log 6,23 UFC/g. Isso chama atenção pois as matrizes aqui utilizadas sofreram processo de pasteurização e esperava-se contagem menor do que amostras que utilizam leite cru. Ruaro et al (2013) identificaram os isolados através de RAPD-PCR com sequenciamento da região V1-V3 do 16s rDNA, e não fez uso de metodologias fenotípicas convencionais alegando que nenhum dos métodos disponíveis que identificam ECN são adequados suficientemente devido à variedade de expressão genética dessas características fenotípicas. Além disso, 77 isolados ECN identificados em amostras de leite cru e queijos feitos com leite cru por Ruaro et al (2013), mostraram uma grande diversidade, em termos de número de espécies e cepas nas fazendas do norte da Itália. Isto é, a composição dos meios de cultura utilizados pode influenciar no perfil de cepas que crescem nela, mesmo quando provenientes de uma mesma amostra.

A comparação entre os dois meios de cultura foi qualitativa e não quantitativa, uma vez que, para fins de regulação, o principal é a classificação de conformidade fornecida no laudo da análise microbiológica.

Em BPA-RFP, 10% das amostras estavam em desacordo com os limites estabelecidos pela RDC para a contagem de ECP, enquanto em MSA, 40% estavam fora do limite. Costa et al (2012) realizaram contagem em placa de amostra de queijo Minas frescal adquiridos no Rio de Janeiro em BPA, e encontraram uma proporção mais elevada de amostras em desacordo com a RDC nº 12 (40%). Dias et al (2016), no entanto, classificaram 30% de suas amostras de queijo Minas artesanais e industriais como fora dos padrões da RDC nº 12 na contagem em BPA, num estudo feito em Goiás. Essa variação pode ter ocorrido pois os queijos analisados nos estudos citados foram provenientes de fazendas e indústrias com características de produção diferentes, com controle de produção e aplicação de boas práticas distintos e, portanto, qualidade do produto final, variável. A fonte da contaminação pode ser desde manipulação inadequada até pasteurização deficiente, ou mesmo recontaminação pós pasteurização.

Zocche et al (2012) classificaram 28 amostras de queijo Minas frescal adquiridas do Rio Grande do Sul pela contagem em BPA e compararam com a RDC nº 12. Similarmente ao presente estudo, 10,7% das amostras estavam em desacordo com a legislação no que diz respeito ao critério microbiológico para a contagem de ECP.

Através da avaliação qualitativa dos meios de cultura BPA-RPF e MSA feita nesse trabalho, não foi possível afirmar se eles são diferentes entre si para uso em amostras de alimentos. No que diz respeito às amostras contendo genes de virulência, a maior parte delas estava em acordo com leis vigentes (BRASIL, 2001) pela contagem em placa de ECP com ambos os meios, classificando os queijos em condições adequadas para consumo. Entretanto, o MSA foi capaz de avaliar como impróprias para consumo um número maior de amostras (4/9) com isolados carreadores de genótipo de virulência quando comparado ao BPA-RPF (1/9).

Uma amostra (Q4) em particular apresentou um grande número de isolados com genótipo de virulência e uma grande variedade de padrão de combinação de genes de virulência. O elevado número de genes de virulência demonstra que possivelmente há um reservatório dessas cepas virulentas que entrou em contato com o processo de produção do queijo, seja o próprio rebanho ou o manipulador. Olivindo et al (2009) realizaram o monitoramento da qualidade do leite de cabra por meio da detecção de *S. aureus* em amostras de mãos de ordenhador, tetas das cabras, leite, ordenhadeira e água. Foram observados comportamentos muito similares das bandas através de REP-PCR, o que pode indicar que os isolados são clones epidemiológicos. As mãos do ordenhador frequentemente caracterizaram-se como iniciador de contaminação nas amostras *S. aureus*, relata. Ressalta-se que a amostra Q4 estaria classificada como “imprópria para consumo” de acordo com a RDC nº 12 na contagem em BPA-RPF. Portanto, caso o monitoramento de todo o lote fosse feito previamente, ele poderia ser retirado de circulação e não representaria um risco para saúde. Recomenda-se estudos de identificação dos isolados e seus complexos clonais para saber a possível fonte proveniente dessa contaminação.

Vicentini et al (2013) avaliaram o custo de adequação de vinte estabelecimentos produtores de queijo em Campos das Vertentes (MG), com aplicação de questionário com itens referentes a: qualidade da água; manejo sanitário do rebanho; higiene da ordenha; instalações (curral de espera, sala de ordenha e queijaria); controle da qualidade da matéria-prima e dos queijos; higiene pessoal dos manipuladores; equipamentos e utensílios; limpeza das instalações; destino de dejetos e tratamento de efluentes; transporte e comercialização. Eles comprovaram que, tanto os produtores de queijos artesanais, quanto de queijo industriais, necessitam de investimentos para adequação a legislação de Minas Gerais, os quais estão acima da renda auferida pelas suas produções individuais. Os autores ainda propõem uma alternativa para os produtores de queijo não artesanal, que representa a maioria, que seria a formação de associações para centralizar a produção.

Bennett; Hait e Tallent (2015) consideram que a contagem mínima de *S.*

aureus para produção de EE é de log 5 UFC/g. Das amostras com cepas toxigênicas, analisadas nesse estudo, duas (Q4 e Q9) apresentaram isolados *S. aureus* toxigênico. Entretanto, nenhuma delas apresentou contagem de ECP superior a log 4,23 UFC/g. Portanto, é possível que, uma vez ingeridos, esses alimentos não causassem intoxicação alimentar. Ainda assim, é necessário que o dado relativo à contagem mínima exigida seja reconsiderado quando o alimento contaminado é ofertado a população imunocomprometida.

Para fins de avaliação de alimentos, a RDC considerar ECP como *S. aureus*, fornece resultado reprodutível. Mas é importante destacar que há outras espécies de estafilococos que são coagulase positiva, e o cálculo de ECP baseado apenas em *S. aureus* pode subestimar a real contaminação presente nessa matriz alimentar. Entretanto, em termos de custo e tempo, essa metodologia, baseada na ISO 6888-2 é vantajosa, já que foi aplicada uma PCR *multiplex* que identificou espécies coagulase negativa e *S. aureus*. Figueiroa et al (2009) pesquisaram a presença de *Staphylococcus sp.* enterotoxigênico em 10 amostras de queijo coalho em Pernambuco. Isolaram 20 cepas de *Staphylococcus sp.* e desses 10 foram reconhecidos como *S. aureus* coagulase positiva, 3 foram identificados como ECN, porém outros 6 foram identificados como outras espécies de ECP não-*S. aureus*.

A caracterização em nível de gênero das cepas isoladas de ambos os tipos de ágar utilizados, foi feita com a amplificação do gene *tuf* (*tstag*). Outros estudos já utilizaram os genes *16S rRNA* ou o *hsp60* para este fim. Entretanto, a PCR desenvolvida com base no gene *tuf*, que codifica o fator de alongação Tu (EF-Tu), segundo Martineau et al (2001), mostrou-se altamente sensível e específica.

Uma identificação mais apurada desses isolados de ECN em nível de espécie é recomendada para entendimento do seu potencial patogênico e monitoramento epidemiológico. Uma variedade de espécies ECN tem sido identificada em amostras de leite e seus derivados (MARTINS et al, 2014; NUNES et al, 2016; RUARO et al, 2013).

É importante ressaltar que os queijos dessa pesquisa, de acordo com o

rótulo, foram produzidos a partir de leite pasteurizado. Isto é, o leite sofreu processo de aquecimento a 65°C por 30 min para eliminar microrganismos prejudiciais a saúde, como *S. aureus*. Essa é a etapa inicial de produção do queijo e, portanto, a partir dela, qualquer fonte de contaminação microbiológica, não será mais tratada nem química, nem termicamente. Torna-se essencial o cuidado com a higiene dos utensílios, dos equipamentos, dos manipuladores e dos ingredientes a entrarem em contato com o alimento (MEDEIROS et al, 2013). No presente estudo, foram detectados 32 isolados *S. aureus* (12%), sendo 70% das amostras positivas para esse microrganismo e 40% das amostras com potencial toxigênico. Zeinhom; Abdel-Latef e Jordan (2015) encontraram proporção baixa (12%) de *S. aureus* em amostras de queijo feta provenientes de mercados no Egito, sendo que 4% das amostras possuíam *S. aureus* toxigênico.

Embora não haja parâmetro na legislação para ECN, a contagem média de log 5,49 UFC/g encontrada nesse estudo, estaria fora dos padrões equivalentes a ECP. Fontes et al (2013) pesquisaram 35 amostras de queijo fresco de Juiz de Fora (MG) quanto ao perfil de ECN, sendo isoladas 277 cepas e a contagem em MSA variou de log 6,58 UCF/g a 7,45 UFC/g.

Além do mais, no presente estudo, 30% (42/140) dos isolados ENC possuíam genótipo toxigênico e desses, 45,2% (19/42) carregavam genes que codificam EE. Ou seja, a maior parte dos ENC isolados podem ter a capacidade de produzir toxinas (SEB e SED), que ao serem ingeridas, causariam intoxicação alimentar. Essa contaminação pode ter sido proveniente de leite contaminado fornecido por vacas com mastite subclínica. Isto é, infecções nas tetas sem sintomas aparentes e que não foram notadas pelo ordenhador, ou não passaram por testes de detecção de mastite no leite. Os sistema APPCC proporciona que a matéria prima utilizada para elaboração do queijo Minas tenha procedência verificada e seja analisada quanto aos aspectos químicos, físicos e microbiológicos, antes de entrar na linha de produção (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

Martins et al (2014) utilizaram o BPA para avaliar contaminação de queijo Minas padrão e frescal. Nesse meio, 17% dos isolados considerados

Staphylococcus spp. foram considerados do gênero *Micrococcus sp.* através do teste da furazolidona. Nesse estudo a diferenciação foi feita através do marcador de gênero *tstag* e 9% não possuíam esse marcador. Poucos estudos fazem essa diferenciação, mas ela é indispensável para evitar erros de identificação (MARTINS et al, 2014).

Muitos estudos diferenciam ECP de ECN através da identificação das espécies coagulase negativas por PCR. Entretanto, os levantamentos atuais (ANVISA, CDC) mostram o crescimento do número de espécies coagulase negativa de importância clínica e para a indústria de alimentos. Portanto, ensaios que detectem todas as espécies relevantes em um mesmo protocolo tornam-se cada vez mais desafiadores de serem desenvolvidos.

No geral, a contagem de ECN é feita apenas por eliminação das espécies *S. aureus* em uma população de *Staphylococcus sp.* Ou seja, cepas não identificadas com genes espécie-específico (*femA*, *coa*, *nuc*, *spa*) para *S. aureus* são consideradas ECN. Embora, esse método seja válido em casos de identificação de um único patógeno, na caracterização de uma população contaminante diversa, pode levar a resultados superestimados. Por exemplo, algumas espécies de *S. aureus* podem não ter gene *coa* detectado através de determinada PCR. Ou outras espécies coagulase positiva que não possuem marcadores *femA*, *nuc* ou *spa*, podem ser consideradas ECN de maneira errônea (OKOLIE et al, 2015).

Diferente da maioria dos ensaios que utilizam a região do 16s rRNA como alvo para identificação, no caso dos ECN, esse alvo possui baixo poder discriminatório. Com isso, o protocolo aqui utilizado baseou-se na sequência do gene *tuf* de diversas espécies de ECN, que serviu de base para o desenvolvimento de um primer para espécies ECN (OKOLIE et al, 2015). Estudos demonstram que a análise da sequência do gene *tuf* para identificação de ECN apresentou resultado reprodutível e preciso. Hwang et al (2011) compararam três eixos de identificação de ENC: o sequenciamento do 16s rRNA em quatro diferentes bases de dados, com a análise do gene *tuf* em duas bases de dados, com dois sistemas de identificação fenotípica. Os resultados

mostraram que a análise do gene *tuf* tem melhor poder discriminatório para ECN quando comparado ao 16s rRNA (HWANG et al, 2011).

Marcadores genéticos de virulência, são importantes para a determinação de cepas com potencial para causar intoxicação estafilocócica ou disseminar habilidades virulentas (SANTANA, E. et al 2010). Neste trabalho dos 172 isolados que foram testados para a presença de genes de virulência, 27,9% (48/172) apresentaram pelo menos um gene de virulência (*seb*, *sed*, *eta*, *etb* e/ou *etd*). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Costa (2010), que pesquisou cinco genes para EE (EEA, B, C, D e E) em 111 *Staphylococcus spp.* isolados de queijo minas frescal e 30,6% foram positivas para pelo menos um gene.

Foram encontrados 10 perfis distintos de cepas carreando combinação de genes de virulência e de caracterização de *Staphylococcus sp.* O mais prevalente foi *cns+eta* (31,25%), seguido de *cns+eta+etd*. A combinação *spa+seb* foi a mais prevalente da espécie *S. aureus* associadas a genes de EE. Segundo Rosa et al (2014), os perfis dos genes para as EE parecem ser variáveis entre diferentes anos e origens geográficas.

Nenhum dos isolados carreavam genes *sea* ou *sec*. Estudos anteriores demonstram que a ausência ou baixa incidência do *sec* é usual, no que diz respeito a isolados de *Staphylococcus sp.* em amostras de leite e derivados (COSTA et al, 2012; NUNES et al, 2016; VERAS et al, 2008; ZEINHOM; ABDEL-LATEF; JORDAN, 2015). Zinhim, Abdel-Latef e Jordan (2015) não encontraram o gene *sea* em nenhum de seus isolados, e o mais prevalente foi o gene para SEB, semelhante ao nosso estudo. Com relação a SEB, sabe-se que ela é inativada pela pepsina em pH próximo de 2, ou seja, pode perder sua função durante o processo digestivo (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

A maioria dos genes EE é controlada pelo locus *agr*. Os genes *seb*, *sec* e *sed* têm sido demonstrados como *agr*-dependentes, enquanto os genes *sea* e *sej* como *agr*-independentes (SANTANA, E. et al, 2010, BAYLES, 1989). Isso pode explicar a prevalência de *sec* e *sed* em um mesmo isolado ou cepas provenientes de uma mesma amostra.

Nesse estudo, o gene para EE mais prevalente foi o de EEB e EED, enquanto nenhuma cepa carregava o gene *sea*. Mas a maioria das pesquisas de revisão relatam que os genes mais envolvidos em intoxicação alimentar são *sea* e *sed* (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014; SANTANA, E. et al, 2010), sendo necessário também uma quantidade menor de microrganismos para a produção dessas EE, quando comparadas aos outros tipos. A maior parte dos *Staphylococcus spp.* envolvidos em surtos de intoxicação, entre 1998-2002, em Minas Gerais, carregava gene para EEA (VERAS et al, 2008).

As EE são tipicamente associadas a *S. aureus* como fator de virulência que causa supressão do sistema imune (PARK et al, 2011). Apesar disso, no presente estudo, também foram encontradas cepas ECN carregando genes de EE. Dezenove (13,6%) isolados ECN carregavam pelo menos um gene para EE. Dessas, quinze cepas eram carreadoras do gene *sed*. Como dito acima, a maior parte dos surtos de DTA são associados a EED ou EEA. Isso sugere que muitas vezes a intoxicação alimentar pode ser estabelecida por cepas ECN. No estudo de Veras et al (2008), os isolados *Staphylococcus sp.* envolvidos em surtos alimentares classificados como ECN, foram capazes de produzir a toxina na forma detectável em ensaio imunológico. Mas o *sed* foi o gene menos encontrado, divergindo do nosso estudo.

Nunes et al (2016) pesquisaram através de PCR genes para EEA até EEI e EE-*like* em 6 amostras de queijo Minas frescal comercializados no Rio de Janeiro. Dos 10 isolados ECN estudados, o gene *seb* foi carregado por 90% e o *sec* por 70%. Embora o gene *seb*, nesse estudo tenha sido o mais prevalente, a proporção ficou somente em 10%. O referido autor afirmou que o queijo Minas frescal parece deter uma microbiota que além de diversa, possui genes para toxinas superantigênicas.

O método utilizado para a detecção de EE, foi apenas por caracterização molecular. Ou seja, demonstram que o isolado carrega o gene para determinada toxina em seu genoma. Todavia, esse achado não garante a produção das toxinas, devido aos diversos determinantes que influenciam em sua produção,

como pH, temperatura, competição, atividade de água e etc. Portanto, ensaios imunológicos para detectar a produção das EE *in vitro* demonstrariam a capacidade dessas cepas em estabelecerem a intoxicação alimentar (BLAIOTTA et al, 2004). É importante frisar que, especialmente os fatores de virulência *agr*-dependentes, têm sua expressão influenciada por vários fatores ambientais. No caso da produção da EEB, sua expressão aumenta de acordo com a maior produção de peptídeos indutores na mudança da fase log para a fase estacionária, através de sistema *quorum sensing* (ZEINHOM; ABDEL-LATEF; JORDAN, 2015).

Em nosso estudo, muito importante foi a proporção de isolados que carreavam genes para TE. Trinta isolados carreavam genes para TEA, TEB ou TED, sendo que 4 isolados eram *S. aureus*. A maior parte dos trabalhos que analisam amostras de leite e derivados e pesquisam *Staphylococcus spp.* carreador de TE, encontram dados negativos (FERREIRA, 2016; FIGUEIROA et al, 2009; RODRIGUES et al, 2017; SILVEIRA-FILHO et al, 2014). Em isolados clínicos, o carregamento de genes para TE é mais frequente (INDRAWATTANA et al, 2013). Até o momento, não temos conhecimento de nenhum artigo científico publicado com detecção desses genes (*eta*, *etb* e *etd*) em queijo Minas frescal.

A expressão do gene e a produção das TE devem ser confirmadas através de testes imunológicos (JARRAUD et al, 2000). Mas ainda assim, os efeitos da exposição oral de determinantes virulentos como o de produção de TE devem ser esclarecido. Sabe-se que, alguns isolados de *S. aureus* com a habilidade de produzir TEA e leucotoxinas, podem causar enterocolite, com um prognóstico bem distinto das síndromes (SSSS e BI) causadas por essas toxinas em outras cepas (ANEXO A). Os sintomas são semelhantes ao de uma intoxicação alimentar, mas são acompanhados de febre. Isso pode acontecer especialmente em pacientes que são administrados com amplo espectro de antibióticos, permitindo, assim, que essas cepas de *S. aureus* cresçam em detrimento da microflora natural (FOX, 2015).

O gene *eta* está localizado no genoma bacteriano, enquanto o *etb* é encontrada em plasmídeos e a *etd* é encontrada em ilhas genômicas. Portanto,

é possível que as 14 cepas carreadores de gene que codificam TEB e TED, possuam a capacidade de transmissão de suas características. Assim, a disseminação através de alimentos dessas cepas pode significar a exposição de características virulentas a cepas circulantes na comunidade (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

Além de aspectos relativos as condições higiênico-sanitárias da produção do queijo Minas frescal, a presença de cepas com genótipo de resistência a antibiótico transferíveis é um importante critério de avaliação (SPANU et al, 2012). No presente estudo, nenhum isolado foi positivo para a presença do gene *mecA*. Outros estudos mostraram baixa ou nenhuma presença dessa característica, tanto por análise de perfil por antibiograma, quanto por PCR. Costa et al, (2012) encontraram 77,9% dos isolados *Staphylococcus spp.* obtidos das amostras de queijo Minas Frescal sem o gene *mecA*, e 91,9% não possuíam o genótipo de resistência a metilicina.

Ruaro et al (2013) isolaram 77 cepas de ECN de amostras de leite e queijos de diversos tipos de animais saudáveis, de diferentes fazendas no norte da Itália. O gene *mecA* não foi detectado em nenhum dos isolados. Ele ainda conclui que algumas fazendas ou indústrias de laticínios ainda podem ser considerados ambientes de baixo risco a transferência de suas características de resistência.

Guimarães et al (2013) avaliaram o perfil de susceptibilidade a antibióticos em queijo coalho comercializados em Salvador, Bahia e encontraram apenas 13,3% de ECP resistente a oxacilina através do método de disco difusão. Entretanto, Fontes et al (2013) encontraram 81,5% de cepas ECN que carregavam o gene *mecA*, em isolados provenientes de queijo fresco.

Por fim, é necessária a comparação desses achados com perfis de *Staphylococcus sp.* toxigênicos encontrados em isolados de vacas com mastite. Nos casos de mastite estafilocócica, a enterotoxina mais frequentemente produzida é a EEC. Mas de maneira isolada, descrevem-se outros tipos de EE (EEG a EEJ) em casos de mastite, inclusive relacionadas a ECN (KRÓL et al, 2016). Coelho et al (2009) relataram pioneiramente cepas de *S. aureus* com

gene *sea* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica do Rio de Janeiro. Foram encontrados também isolados com outros genes de virulência como o gene para proteína A. Mello et al (2016) analisaram o perfil clonal de isolados estafilocócicos de gado com mastite subclínica em seis estados do Brasil (PR, SC, RS, SP, MG e PE) e foi encontrada uma similaridade genética entre os *S. aureus* estudados. Diferente do nosso estudo, o gene mais prevalente foi o *sea* e o menos prevalente foi o *sed*. Por tanto, são indicados estudos de perfil clonal em cepas isoladas de vacas mastíticas de fazendas produtoras de queijo Minas no Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo.

No presente estudo, não foram encontradas cepas para o gene *tsst* ou *pvl*. Isso está em acordo com estudos feitos tanto em isolados de alimentos, quanto em isolados clínicos de tetas com mastite que encontram ausência ou baixa incidência deste gene (FIGUEIROA et al, 2009; MELLO et al, 2016; NUNES et al, 2016; RODRIGUES et al, 2017; VELASCO et al, 2014).

6 CONCLUSÃO

- A contaminação microbiológica de queijo Minas frescal comercializados em grandes redes de mercados do Rio de Janeiro é uma verdade presente nas amostras aqui estudadas. Em 10 amostras, foram isoladas 266 cepas, sendo 32 caracterizados como *S. aureus* e 140 como ECN, os demais eram outras espécies não-*S.aureus* ou pertencentes a outro gênero.
- Foram encontrados 50 estafilococos com genes para EE ou TE, sendo 42 ECN e 8 *S. aureus*. Os genes encontrados foram *seb*, *sed*, *eta*, *etb* e *etd*. O mais prevalente entre as EE foi o *sed* e o mais prevalente entre as TE foi o *etd*. Mesmo que a capacidade de produção de toxina ainda deva ser confirmada, o isolamento de alguns isolados com genótipo multivirulento pode significar a circulação de cepas com habilidade de transmissão de seus determinantes.
- Quanto aos critérios da RDC nº12, 10% das amostras semeadas em BPA-RPF foram consideradas “impróprias para consumo” e 40% das amostras semeadas em MSA, sendo que, somente uma amostra, não apresentou isolados com genes de virulência. Através da avaliação qualitativa deste trabalho, pode-se apenas afirmar que ambos os meios apresentaram características distintas ou subjetividades na contagem em placa. E embora todos os *S. aureus* com genótipo de virulência tenham sido provenientes do BPA-RPF, pode-se considerar, para fins de pesquisa, o uso de ambos os meios de cultura para contagem de estafilococos.
- O gene que codifica para a resistência a meticilina não foi detectado nos isolados estudados nesse estudo.
- Foram detectados 28 isolados carreadores de gene para TEA, TEB e TED, sendo 24 ECN e 4 *S. aureus*. Até o momento, os autores do trabalho não têm conhecimento de nenhum artigo científico que tenha detectado estes genes (*eta*, *etb* e *etd*) em queijo Minas frescal.
- Os dados aqui apresentados são apenas informações técnicas levantadas

ao longo de dois anos para o desenvolvimento dessa pesquisa. Espera-se que através deles, sejam desenvolvidas novas pesquisas e novas discussões na área de segurança de alimentos, com o foco principal sendo a saúde do consumidor final.

REFERÊNCIAS

AHLSTRAND, E. et al. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures from patients with hematological malignancies during three decades. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1349–54, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744039>>.

AIRES-DE-SOUSA, M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3845–3849, 2007.

ALLAM, A. A. et al. Genotypic Detection of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* in Food. **Egyptian Journal of Madical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 37–45, 2014.

ALMEIDA, J. C. et al. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 1, p. 97–106, 2013.

ÂNGELO, F. F.; ARCURI, E. F.; ANDRADE, N. J. DE. Ocorrência do gene da toxina da síndrome do choque tóxico em *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastite e de leite cru refrigerado. **R. bras. Ci. Vet.** v. 21, n. 1. p. 137–140, 2014.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751–73, 2010.

BARON, S. **Medical Microbiology**. 4th edition. Staphylococcus. Chapter 12. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **J Bacteriol**, v. 171, n. 9, p. 4799–4806, 1989.

BECKER, K. et al. Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5551–5557, 2001.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.

BECKERS, H. J. et al. Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. **Can J Microbiol**, v. 30, n. 4, p. 470–474, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378345>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

BENNETT R. W.; HAIT, J. M.; TALLENT, S. M. *Staphylococcus aureus*. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (Eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington, DC: APHA; p. 387-400. 2015.

BENNETT R. W.; LANCETTE G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Food and Drug Administration. In: **Bacteriological analytical manual (BAM)**. 8ª ed. Arlington: AOAC/FDA; p. 12.01-12.05. 1998.

BERGDOLL, M. S. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 282, n. 1, p. 1–6, jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734822>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus spp.* strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.

BLOMSTER-HAUTAMAA, D. A et al. The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15783–6, 1986.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 87, n. 1, p. 3–9, 2007.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. **Braz. J. Food Technol.**, v. 16, n. 1, p. 73–79, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 62, de 23 de agosto de 2003, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 ago. p. 24, 2003.

____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite Pasteurizado e do Leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 set. Seção 1, p.13, 2002.

____. MAPA. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Seção 1, p. 213, 1999.

____. MAPA. Instrução Normativa nº 62 de 2011. Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. Seção 1, p. 24, 2011.

____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE). Diretoria de Pesquisa. Coordenação de Trabalho e Rendimento **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Despesas, Rendimentos e Condições de Vida**. Jul. 2010.

____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: Anvisa, 149p.: il.9 volumes, 2013

____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 45-53.

____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças

Transmissíveis. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** (SINAN net). Brasília, 2016.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148–1165, 2010.

BUYSER, M. L. DE et al. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999 - Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 185–194, 2003.

CHAGAS, L. G. et al. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis- Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**. Minas Gerais, v. 28, n. 6, p. 1007–1014, dez. 2012.

COELHO, S. M. O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369–374, 2009.

COSTA, J. DE et al. Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes. **Rev Ins Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 250–8, 2012

COSTA, J. DE. **Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e presença dos genes mecA e qacA/B em *Staphylococcus spp.* isolados de queijo Minas Frescal**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.

DA CUNHA, M. D. L. R. D. S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 70–74, 2006.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DELEO, F. R. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557–1568, 2010. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609619991%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61999-1](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609619991%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61999-1)>. Acesso em: 30 jan. 2017.

DEVRIESE, L. A., VAN DAMME, L. R., FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin) - resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. **Journal of veterinary medicine**. Series B 19:7, p 598-605, 1972.

DIAS, B. F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 57–64, 2016.

DUGGAL, Shalini Dewan *et al.* Staphylococcal bullous impetigo in a neonate. **World J Clin Cases**, v. 4, n. 7, p. 191–194, 2016.

ERTAS, N. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 74–77, 2010.

E.U.A., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Estimates of Foodborne Illness in the United States**. Geórgia, 2011. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>>. Acesso em: 30 jan. 2017

____. Food and Drug Administrations (FDA). **Food compliance program guidance manual**. Chapter 3: Food Biological Hazards. Program 7303-844. Part 3. Project 0. p. 4-7. 2010.

____. National Research Council. **An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients**. 273 p. Washington, DC. 1985.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1997, 47, 590-592. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 26 jan 2017.

FARAHMAND-AZAR, S. et al. Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 1, p. 17–22, 2013.

FERREIRA, M. A. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Minas frescal industrial e artesanal**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

FESSLER, A. T. et al. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1576–82, ago. 2010.

FIGUEIROA, M. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 375–379, 2009.

FLEISCHER, B. Y. B.; SCHREZENMEIER, H. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. **J. Exp. Med.**, v. 167, n. May, p. 1697–1707, 1988.

FONTES, C. O. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA*-encoding coagulase-negative staphylococci isolated from soft cheese in Brazil. **Journal of food science**, v. 78, n. 4, p. M594–9, abr. 2013.

FOX, A. Staphylococci. In: **Microbiology and Immunology On-line**, HUNT, R.C. E-book. Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul. 2015. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm>>. Acesso em: 7 jan. 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 184p. 2002.

GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.** v. 30, n. 1, p. 109–118, 2008.

GENTILINI, E. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 6, p. 1224–1227, 2000.

GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583–592, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>>.

GUIMARÃES, F. D. F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866–2872, 2013.

GÜNAYDIN, B.; ASLANTAŞ, Ö.; DEMIR, C. Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis.

Tropical animal health and production, v. 43, n. 8, p. 1633–7, 2011.

HAIT, J. *Staphylococcus aureus*. In: **Bad bug book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. Food and Drug Administration (FDA). Center for Food Safety and Applied Nutrition. 4. ed. 2012.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 4, p. 267–282, 1989.

HEINRICHS, J. H.; BAYER, M. G.; CHEUNG, A. L. Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 2, p. 418–423, 1996.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L. DE; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, 2011.

HIDALGO, M. R. C. et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1221–1227, 2006.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 40. n. 1.1997.

HO, P. L. et al. Clonality and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* isolates from food animals and other animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 11, p. 3735–3737, 2012.

HOEGH, S. V et al. Variations in the *Staphylococcus aureus*-specific nuc gene can potentially lead to misidentification of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, p. 10–12, 2014.

HOLMES, A. et al. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2384–90, maio 2005.

HUBER, H. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 16, p. 7–10, 2010.

HWANG, S. M. et al. tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4142–4149, 2011.

HEXIS CIENTÍFICA. **Pesquisa de preço Agar manitol Salgado 500g.**

Disponível em: <<http://www.hexis.com.br/produto/agar-manitol-sal-500g>>.

Acesso em: 27 jan. 2017

ICMSF - International Commission On Microbiological Specification For Foods. Microorganisms in foods. **New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.** v. 6, n. 2, p. 763, 2005.

INDRAWATTANA, N. et al. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. **Biomed Research International**, v. 2013, 2013.

JARRAUD, S. et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6517–6522, 2000.

JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background , Virulence Factors , agr Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.

JOHNSON, W. M. et al. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426–430, 1991

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed research international**, v. 2014, p. 827965, jan. 2014.

KRÓL, J. et al. Isolation of *Staphylococcus microti* from milk of dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 182, p. 163–169, 2016.

LADHANI, S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clinical Microbiology And Infection : The Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 301–7, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442563>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

LABOR SHOPPING. Pesquisa de preço de Agar Baird Parker 500g. Disponível em: <<http://laborshopping.com.br/produto/agar-baird-parker-500g/26406>>.

Acesso em: 27 jan. 2017.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics And Molecular Research** : GMR, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917803>>.

LE, K. Y. et al. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 167, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505739>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, n. December, p. 178, 2014.

LOJA SYNTH. Pesquisa de preço Agar Baird Parker 500g. Disponível em: <<http://www.lojasynth.com/reagentes-analiticosmaterias-primas/meios-de-cultura/agar-baird-parker>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

LØVSETH, A.; LONCAREVIC, S.; BERDAL, K. G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3869–72, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=497657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 out. 2015.

LUDWIG BIOTEC. Pesquisa de preço ágar manitol salgado 500g. Disponível em: <<http://ludwigbiotec.com.br/site/Produto/agar-sal-manitol>>. Acesso em: 27 jan. 2017a.

LUDWIG BIOTEC. Pesquisa de preço Suplemento RPF - 8 frascos. Disponível em: <<http://ludwigbiotec.com.br/site/Produto/suplemento-rpf->>. Acesso em: 27 jan. 2017b.

LUZ, I. DA S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARCHI, D. M. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 3, p. 401–407, 2011.

MARTINEAU, F. et al. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2541–2547, 2001.

MARTINS, I. M. et al. Occurrence and Characterization of Enterotoxigenic Potential of *S taphylococcus* Isolated from Dairy Products. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 3, p. 185–192, 20 ago. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12112>>. Acesso em: 24 out. 2015.

MEDEIROS, M. I. M. DE et al. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 98–105, 2013.

Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/14972>>.
Acesso em: 20 jan. 2017.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.

MELLO, P. L. et al. Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2016.

MOROT-BIZOT, S. C.; TALON, R.; LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1087–1094, 2004.

MUELLER, E., HAIM, M., PETNEHAZY, T. et al. An innovative local treatment for staphylococcal scalded skin syndrome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.29, n. 7, 893–897, 2010.

NAKAGAWA, Saori et al. Gene sequences and specific detection for Pantone-Valentine leukocidin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 4, p. 995–1002, 2005.

NIJJAR, C. K.; SMITH, M. H.; ELTRINGHAM, I. J. Adjunctive *mecA* PCR for routine detection of methicillin susceptibility in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1678–81, 2014.

NUNES, R. S. C. et al. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, n. July, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216000849>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

OKOLIE, C. E. et al. Development of a heptaplex PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015.

OLIVINDO, C. S. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1317–1321, 2009.

PARK, J. Y. et al. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary microbiology**, v. 147, n. 1-2, p. 149–54, 2011.

PEREIRA, M. L. et al. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 559–561, 1996.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293–300, 2004.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; MULLARKY, I. K.; JONES, G. M. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. **Virginia Cooperative Extension**, v. 404, n. 229, p. 1–7, 2010.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 340–352, 2005.

RALL, V. L. M. et al. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne pathogens and disease**, v. 7, n. 9, p. 1121–1123, 2010.

RECHTIN, T. M. et al. Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 307–316, 1999.

ROHRER, S.; BERGER-BÄCHI, B. FemABX peptidyl transferases: A link between branched-chain cell wall peptide formation and β -lactam resistance in gram-positive cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 837–846, 2003.

ROSA, D. L. S. O. et al. Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus spp.* isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, n. 1, p. 37–42, 2014.

Disponível em:

<<http://www.visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/26/196>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

RUARO, A. et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 106–111, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.013>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

SALASIA, S. I. et al. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. **J Vet Sci**, v. 12, n. 4, p. 353–361, 2011.

SANSANO, C. N. Literature review: Bovine mastitis caused by Coagulase-Negative. **3rd Startvac Library**. Espanha. 2010

SANTANA, A. et al. Antimicrobial action of lactoferrin on *Staphylococcus aureus* inoculated in Minas frescal cheese. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición - Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 62, n. 6, p. 68 – 72, 2012.

SANTANA, E. H. W. DE et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545–554, 2010.

SANTOS, K.R. **Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de Staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2008.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Técnicas e Boas práticas na Produção do queijo. **Resposta Técnica**. 2014. 6 p.

SILVA, F. T. Queijo minas frescal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informação Tecnológica**. 1ª edição. Brasília, DF. 2005. 50 p.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. B. Processamento de leite. **Material do curso técnico em alimentos**. EDUFRPE. Recife, 2012. 167 p.

SILVA, Neusely. et al. **Manual de Metodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Varela. 2010.

SILVA, Nathalia C. C. et al. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 227–33, ago. 2014.

_____. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 11, p. 6856–62, 2013.

SILVEIRA-FILHO, V. Antibiotic Resistance and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cow's Milk and Dairy Products in Northeast Brazil. **Journal of Food Protection**. Abr. 2014.

SKOV, R. et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 3, p. 193–200, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.029>>. Acesso em: 2 jan 2017.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 53–57, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.015>>. Acesso em: 2 jan 2017.

UENO, M.; JORGE, A. O. C. COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES DE ANÁLISE DE DNA CROMOSSOMAL DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA. **Revista Biociências Taubaté**, v. 8, p. 43–50, 2002.

UNAL, N.; CINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative

staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 2, p. 369–75, fev. 2012.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias (CE). Regulamento nº 2073 de novembro de 2005. Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos produtos alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. 338, p. 1–26, 2005.

____. Comissão das Comunidades Europeias (CE). **Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses**. UE, 2003. 73 p. Disponível em: <ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf>. Acesso em 14 fev. 2017.

VELASCO, V. et al. Multiplex real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes from selective enrichments from animals and retail meat. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97617, 2014.

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, n. 4, p. 410–415, 2008.

VICENTINI, N. M. et al. Custo da Adequação de Pequenos Produtores de Queijos aos Requisitos da Legislação do Estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 5–14, 2013.

VIÇOSA, G. N. et al. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus spp.* in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 447–452, 2010.

WANG, N.; NEILAN, A. M.; KLOMPAS, M. Staphylococcus intermedius infections: Case report and literature review. **Infectious Disease Reports**, v. 5, n. 1, 2013.

WANG, X. et al. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 6, p. 527–34, jun. 2014.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Relatório técnico. Geneva, Switzerland. 2014. 257 p. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em 2 jan. 2017.

____. Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. In: Fifth formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG). **Anais eletrônicos**. Geneva, Switzerland. p. 8-12. 2013

____. **World Health Day 2015**. Campaign tool kit, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/en/>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

WU, Dejing et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 35–45, 2011.

ZHANG, K. et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4947–55, nov. 2004.

ZEINHOM, M. M. A.; ABDEL-LATEF, G. K.; JORDAN, K. The Use of Multiplex PCR to Determine the Prevalence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk, Feta Cheese, and Hand Swabs. **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. M2932–M2936, 2015.

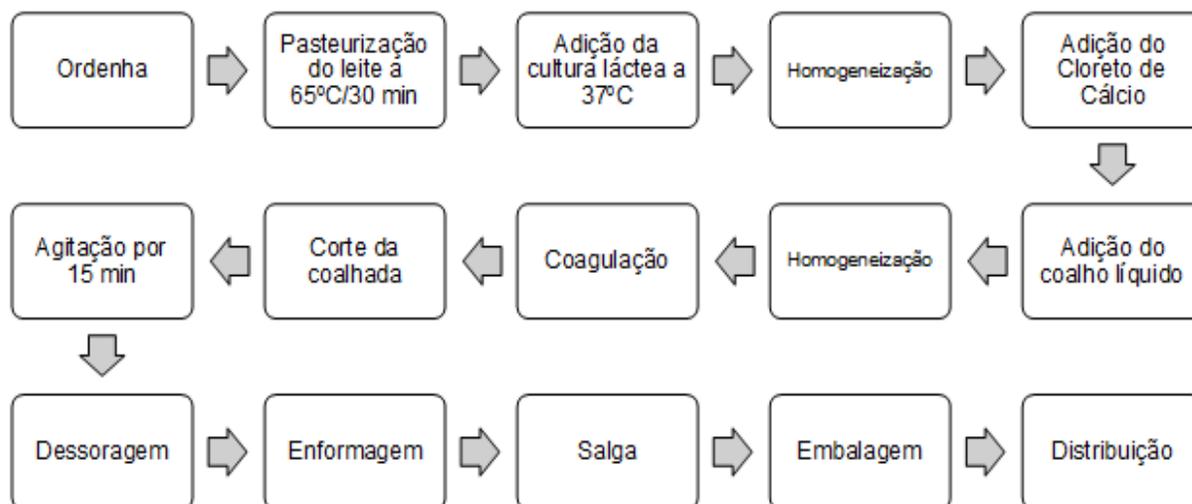
ZOCHE, F. et al. Estafilococos coagulase positiva em queijos minas frescal e minas padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 119–124, 2012.

**ANEXO A - FIGURA DA SINTOMATOLOGIA DA SÍNDROME DA PELE
ESCALDADA, CAUSADA PELA TOXINA EXFOLIATIVA PRODUZIDA POR S.
aureus.**



Fonte: Dermatology Handbook for medical students & junior doctors. British Association of Dermatologists.

ANEXO B - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL.



Adaptado de Material Técnico – Queijo Minas Frescal. Embrapa. 2005.

ANEXO C – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES (PARTE I)**1. Brain Heart Infusion (BHI)**

Infuso de cérebro bovino: 200,0 g/L;

Infuso de coração bovino: 250,0 g/L;

Proteosepeptona: 10,0 g/L;

Dextrose: 2,0 g/L;

Cloreto de sódio: 5,0 g/L;

Fosfato dibásico de sódio: 2,5 g/L; Água purificada: 1000 ml.

2. Ágar tripticaseína de soja (TSA)

Peptona de caseína 15g

Peptona de soja 5g

Cloreto de sódio 5g

Ágar 15g

Água purificada.1000mL

Suspender os componentes em água purificada e aquecer sob agitação até a completa dissolução do ágar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH: 7,3± 0,2 a 25°C.

ANEXO C – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES (PARTE II)**3. Baird-Parker Agar Base (BPA)**

Triptona 10,0g/l

Extrato de bovino 5,0g/l

Extrato de leveduras 1,0g/l

Cloreto de lítio 50g/l

Glicina 12,0g/l

Piruvato de sódio 10,0g/l

Telurito de potássio 0,1

Ágar 20,0/l

Emulsão de gema de ovo 50,0 ml /l

pH 6.8 ± 0,3

4. Suplemento Fibrinogênio e plasma de coelho liofilizado (RPF)

plasma de Coelho 2,5ml/frasco

Fibrinogênio 500,0mg/frasco

Inibidor de Tripsina 2,5mg/frasco

Telurito de Potássio 2,5mg/frasco

ANEXO C – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES (PARTE III)**5. Ágar manitol salgado (MSA)**

Extracto de bovino 1,0g/l
Hidrolisado pancreático de caseína 5,0g/l
Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g/l
Cloreto de sódio 75,0g/l
D-Manitol 10,0g/l
Vermelho de Fenol 0,025g/l
Ágar 15,0g/l
pH: 7,4 ± 0,2

6. Solução de lise para bactérias Gram negativas

Tris/HCl 20 mM
EDTA 2 %
% Triton X-100 1 mM
Lisozima 20 mg/mL
pH 8

7. Tampão B3 (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) – em 100ml de tampão de lise

Gu- HCl 36-50%
pH: 4,8

8. Tampão BW (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) – em 100 ml de tampão de lavagem

Gu-HCl 36-50%
Isopropanol 20-50%

ANEXO C – MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES (PARTE IV)

9. Tampão B5 (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) – em 100 ml de tampão de lavagem
10mM Tris-HCl
80ml etanol

10. Tampão BE (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, 2016) – em 100ml de tampão de eluição
5mmM Tris-HCl
pH: 8,5

11. TrisHCl-EDTA

Tris HCl 10 mM

NaCl 100 mM

1mM EDTA

pH: 8,0

APÊNDICE A – FOTOGRAFIA DE AMOSTRA DE QUEIJO APÓS PROCESSO DE MACERAÇÃO.



Fotografia retirada pelos próprios autores

**APÊNDICE B – FOTOGRAFIA DE SUJIDADE EVIDENTE DENTRO DA
EMBALAGEM DA AMOSTRA Q3 LACRADA.**



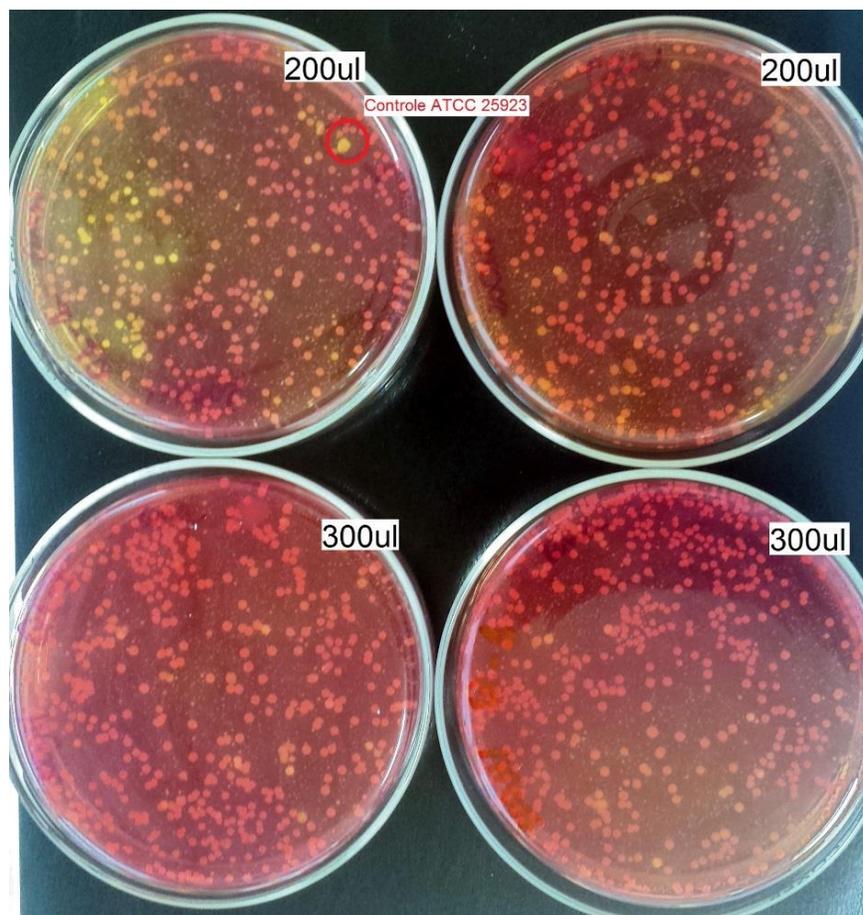
Fotografia retirada pelos próprios autores

APÊNDICE C - PLACA DE PETRI COM BPA-RPF COM FORMAÇÃO DE MASSA SÓLIDA.



Fotografia retirada pelos próprios autores

**APÊNDICE D - PLACAS DE MSA COM CRESCIMENTO DE COLÔNIAS
FERMENTADORAS (AMARELAS) E NÃO-FERMENTADORAS DE MANITOL
(AVERMELHADAS).**



Fotografia retirada pelos próprios autores