**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva
potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo
Minas frescal no estado de São Paulo**

Gabriela Oliveira e Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2013**

Gabriela Oliveira e Silva
Médica Veterinária

Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Silva, Gabriela Oliveira e

Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo / Gabriela Oliveira e Silva . - - Piracicaba, 2013.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. S. aureus 2. PCR 3. Enterotoxinas estafilocócicas 4. Higiene de laticínios 5. Queijo Minas frescal 6. Rastreabilidade I. Título

CDD 637.353
S586e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais: é com vocês, é por vocês e é para vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a oportunidade de ter vivenciado mais essa experiência, por ter me dado condições de cumprir com as minhas obrigações, por ter me fortalecido quando precisei e por ter colocado na minha vinha verdadeiros anjos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada.

Aos meus pais, Jaime e Dativa, meu pilares, formadores do meu caráter, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Agradeço pelo amor incondicional e por terem compreendido a minha ausência física em momentos importante. E às minhas irmãs Roberta e Fabiana, companheiras, confidentes e cúmplices de jornada, obrigada por todo o carinho de sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ernani Porto por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada e pela oportunidade de trabalho, além dos valiosos ensinamentos.

À Prof. Dra. Vera Lúcia Mores Rall, da UNESP/Botucatu, por ter concedido os controles positivos de enterotoxinas estafilocócicas.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, da FEA/Unicamp, por ter permitido que eu desempenhasse parte do meu experimento no Laboratório de Toxinas Microbianas/Unicamp, assim como a técnica Norma Miya e o doutorando Rafael por terem me recebido atenciosamente e por todo ensinamento ministrado em relação ao aparelho MINI VIDAS STAPH2®.

À Profa. Silene Bruder Silveira Sarmento, por ter cedido equipamentos do Laboratório de Produtos Amiláceos para desenvolvimento de parte das minhas análises, bem como o auxílio da técnica Carlota dos Anjos e do doutorando Manoel Divino Matta Júnior.

À professora e amiga Dra. Carolina Rodrigues da Fonseca por todo ensinamento, companheirismo, parceria de trabalho, por acreditar e confiar em mim. Agradeço por ter me feito abrir os olhos e o coração para o universo acadêmico.

À Dra. Caroline Pamplona por todo ensinamento, confiança e amizade. Agradeço principalmente por ter me apresentado ao incrível mundo da biologia molecular.

À Profa. Janaina Rigonato, da UNESP/São José do Rio Preto, pelo auxílio na interpretação do ERIC-PCR.

À técnica do Laboratório de Higiene e Laticínios, Denise Leme, por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Higiene e Laticínios: Amanda Marabesi, Caio Morales, Lais Zerbeto, Fabiane Furlan, Júlia Trevilin, Jéssica Pereira, Patricia Santo André, Paula Bachin e Victor Corrá, agradeço pelo auxílio nas análises e pelos momentos de descontração.

Agradeço especialmente à Amanda Marabesi, Caio Morales, Lais Zerbeto, Patricia Santo André e Júlia Trevilin, pelos inúmeros fins de semana e feriados no laboratório, por todo auxílio nas análises no decorrer do meu projeto, pelas idas a Unicamp, pelos momentos de amizade, descontração e brincadeiras. Sou grata por ter conhecido vocês e tenho certeza que todos brilharão profissionalmente.

Aos amigos de laboratório Marjory Xavier e Guilherme Martin por toda ajuda, revisão de textos, tabelas e discussão produtiva acerca do meu experimento, além dos momentos de descontração e dos inúmeros cafés no meio da tarde.

Aos amigos Antônio Santana, Maressa Morzelle e Patrícia Bachiega por terem estado ao meu lado, comemorando nos momentos de alegria e me dando força nos momentos de tristeza. Piracicaba não seria a mesma sem vocês!

À família Sementes de Luz composta amorosamente por: André e Bel Freitas, Serginho e Dalva, Patrícia Marinho, Carla Munhoz, Fred Vieira, Carolzinha, Flavinha e Wagner, Lucas Chagas e Luciana Gevartosky, dentre outros.

Agradecimento especial aos amigos Carol Lima Tabule, Flavinha Custodio e Lucas Chagas que estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes durante essa jornada. Obrigada queridos por me permitir fazer parte da vida de vocês.

À Dra. Jeanne Mara Vaz de Oliveira que me auxiliou a abrir a minha mente e a enxergar coisas que sozinha eu jamais conseguiria, minha eterna gratidão.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP pela ajuda e atenção, especialmente a Regina, Fábio e Ana.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse projeto.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
Oliver Wendell Holmes

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
2.2 Enterotoxinas estafilocócicas (SE)	19
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp em leite e derivados.....	21
2.4 Métodos de detecção de <i>Staphylococcus</i> spp e enterotoxinas.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Caracterização do universo amostral.....	27
3.2 Análises Laboratoriais	28
3.2.1 Identificação e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase positiva.....	28
3.2.2 Testes fenotípicos	29
3.3 Análises genotípicas	29
3.3.1 Reativação das culturas	29
3.3.2 Extração de DNA pelo Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”	29
3.3.3 Amplificação de fragmentos do gene nuc específico para <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> e <i>S. intermedius</i>	29
3.3.4 Amplificação de genes SE envolvidos na síntese de enterotoxinas	30
3.3.5 Tipagem das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva por ERIC-PCR.....	32
3.4 Análises imunoenzimáticas	33
3.4.1 Detecção de enterotoxinas em meio de cultura de cepas puras e em amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijo Minas frescal.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Ocorrência e contagens de estafilococos coagulase positiva.....	35
4.2 Caracterização fenotípica de isolados de <i>staphylococcus</i> spp. coagulase-positiva.....	42
4.3 Extração do DNA genômico pelo Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”	42
4.4 Amplificação de fragmentos do gene nuc específico para <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> e <i>S. intermedius</i> descritas por Sasaki et al. (2010)	43
4.5 Tipagem das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva por ERIC-PCR.....	45
4.6 Amplificação de fragmentos de genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas (SE) ..	50
4.7 Análises Imunoenzimáticas	60

5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo

As condições de produção de queijos frescos são favoráveis à ocorrência e à produção de enterotoxinas produzidas por estafilococos, sendo estes os principais micro-organismos relacionados aos casos de intoxicação alimentar no mundo, tornando-se necessários estudos sobre a rastreabilidade das fontes de contaminação durante a fabricação, identificação genotípica e habilidade de cepas em produzir enterotoxinas. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar estafilococos positivos para o teste de coagulase, potencialmente produtores de enterotoxinas em laticínios do estado de São Paulo, desde o leite recebido até o produto final. A técnica da mPCR foi utilizada para identificar três espécies de *Staphylococcus* coagulase-positiva (*S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*) entre os isolados obtidos de diferentes pontos de processamento em laticínios do Estado de São Paulo. O perfil genético das cepas foi avaliado através da comparação de bandas pela técnica *Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) e graficamente demonstrados por um dendrograma. O DNA de 102 cepas isoladas, de amostras de leite cru, leite pasteurizado, coágulo, manipulador, superfícies de equipamentos de laticínios do Estado de São Paulo e queijos foi extraído e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se *primers* específicos para a detecção de fragmentos dos genes envolvidos na síntese das toxinas (SE) do tipo A, B, C, D, E, G, H, I e J. Das 102 cepas avaliadas, 5 apresentaram amplificação do fragmento do gene responsável pela codificação da toxina A, 3 para toxina C, 56 para toxina G, 59 para toxina H, 9 para toxina I, e nenhuma para toxinas B, D, E e J. Amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijos produzidos nos laticínios e dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva que apresentaram ao menos algum dos genes relacionados à produção de toxinas clássicas (A, B, C, D e E) foram submetidos a um teste de detecção de enterotoxinas pelo sistema VIDAS® Staph Enterotoxin (SET2). Os dados obtidos para a identificação molecular das cepas, da ocorrência de cepas portadoras dos genes relacionados à produção de enterotoxinas e da produção fenotípica das enterotoxinas foram submetidos ao teste qui-quadrado. O presente trabalho confirmou que o risco de intoxicação estafilocócica é real, pois foi encontrada enterotoxina em amostras de leite pasteurizado e queijos.

Palavras-chave: *S. aureus*; PCR; Enterotoxinas estafilocócicas; Higiene de laticínios; Queijo Minas frescal; rastreabilidade

ABSTRACT

Genotypic and phenotypic study of potentially enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci isolated from production lines of Minas fresh cheese in São Paulo

The production conditions of fresh cheese are favorable to the occurrence and production of enterotoxin produced by *Staphylococci*, which are the main microorganisms related to food poisoning cases in the world, requiring studies to trace the sources of contamination during manufacturing and genotypic identification ability of strains to produce enterotoxin. This study aimed to isolate and identify staphylococci positive for coagulase test, potentially producing enterotoxins in dairy products in the state of São Paulo, from milk receiving to final product. In three dairy producers of Minas fresh cheese, samples were collected from various points in the manufacturing process. the technique of mPCR was used to identify three coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. hyicus* and *S. intermedius*) between isolates from different points of a processing dairy in the state of São Paulo. The genetic profile of the strains were evaluated by comparing the bands through the technique Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) and were graphically displayed by a dendrogram. The DNA of 102 strains isolated from samples of raw milk , pasteurized milk , curd, handler and equipment surface from dairies in São Paulo State and cheese were subjected to the polymerase chain reaction (PCR), using primers for the detection of specific fragments of the genes involved in the synthesis of toxins (SE) of type A, B , C , D, E, G , H, I and J. Of the 102 strains tested, five showed amplification of the gene fragment encoding toxin A, three for toxin C , 56 to toxin G, 59 to toxin H, 9 to toxin I, and none for toxins B D, E and J. For confirmation, each isolated strain carrying at least some of the genes related to the production of classical enterotoxins, cheese and milk samples was subjected to detection by enterotoxigenic VIDAS® Staph Enterotoxin II (VIDAS SET2) bioMérieux. This identification reinforces the need to adopt proper hygiene practices in the dairy, avoiding thus the spread of these microorganisms and the possible production of enterotoxin . The data obtained for the molecular identification of the strains, the occurrence of strains carrying the genes related to the production of enterotoxin production and phenotypic enterotoxins were subjected to the Chi-squared test. This work confirmed that the risk of staphylococcal food poisoning is real, because enterotoxin was found in samples of pasteurized milk and cheeses.

Keywords: *S. aureus*; PCR; Staphylococcal enterotoxin; Dairy hygiene; Minas fresh cheese; traceability

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os consumidores preocupam-se com os aspectos nutritivos e de segurança microbiológica dos alimentos. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas um grande problema para a saúde pública (SANTANA et al., 2010). Os alimentos são suscetíveis a contaminações provocadas por diferentes agentes etiológicos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças por ação dos próprios micro-organismos ou de suas toxinas (STAMFORD et al., 2006).

As intoxicações alimentares geralmente ocorrem na forma de surtos alimentares, caracterizadas por dois ou mais casos de uma doença, resultante da ingestão de um alimento em comum. Segundo Freitas (2005), no ano 2000, 2,1 milhões de pessoas morreram de doenças diarréicas, que em sua maioria podem ser atribuídas à ingestão de água e alimentos contaminados.

O leite é um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de micro-organismos, por apresentar-se rico em nutrientes e conter elevada atividade de água. O desenvolvimento desses micro-organismos constitui um risco à saúde da população por serem transmitidos ao homem, podendo causar sérios danos à saúde do mesmo (AMARAL et al., 2004). A contaminação do leite pode ocorrer durante ou após a ordenha, através da manipulação inadequada durante o processamento de produtos lácteos (CHAPAVALL, 2003).

A produção de queijo no Brasil, bem como a obtenção do leite, enfrenta problemas relacionados a boas práticas de manipulação e higiene das operações. A realização de um processo de limpeza e sanificação nos utensílios e manipuladores envolvidos no processamento de alimentos é o suficiente para evitar a proliferação de micro-organismos indesejáveis, garantindo dessa forma um produto de melhor qualidade microbiológica para o consumidor (AKUTSU, 2001).

A elaboração de queijos é uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínio, sobretudo no Brasil. Sendo hoje o terceiro queijo mais consumido no país, o Minas frescal é um produto interessante para as indústrias pelo seu alto rendimento (kg/L) e giro rápido no mercado, propiciando assim um retorno mais imediato do capital investido (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO - ABIQ, 2007).

Os estafilococos são frequentemente associados a casos de intoxicação alimentar em todo o mundo devido à capacidade de algumas cepas produzirem enterotoxinas. O processo e as características do queijo Minas frescal, oferecem boas condições para contaminação e sobrevivência destes micro-organismos. Suas enterotoxinas são termo-estáveis, ou seja, mantêm sua estabilidade mesmo após os tratamentos térmicos utilizados nos laticínios,

representando risco aos consumidores e tornando extremamente necessário o controle destes micro-organismos desde os estágios iniciais de produção, já que a presença de toxinas no leite cru permanecerá mesmo após a pasteurização (75° C/15s).

A capacidade de determinadas cepas de *Staphylococcus* spp. em produzir as enzimas coagulase e termonuclease são geralmente associadas com a habilidade em produzir enterotoxinas (LANCETTE; BENNET, 2001). Por muito tempo, a espécie *Staphylococcus aureus* foi considerada a única do gênero *Staphylococcus* com capacidade de produzir enterotoxinas e coagulase. Entretanto, outras espécies com cepas produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas posteriormente, incluindo relatos de alguns surtos de intoxicação alimentar atribuídos a elas (GANDRA, 2006).

A presença de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicos em queijos indica uma possível contaminação pós-processamento, pois a bactéria em si é termolábil. Para desenvolver estratégias efetivas para minimizar a presença de estafilococos dentro do ambiente de processamento de queijos frescos, torna-se necessário entender as fontes de contaminação dentro da indústria e as características destes micro-organismos, como a produção de enterotoxinas.

Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, traçar um perfil de semelhança genética entre elas e estudar a presença de genes responsáveis pela produção de diferentes enterotoxinas estafilocócicas e a possível expressão desses genes através da identificação de toxinas em amostras de leite, queijo em condições ótimas de crescimento. Além disso, foi possível verificar a origem dos isolados dentro do fluxograma do queijo Minas frescal e assim rastrear as possíveis fontes de contaminação na linha e processamento e a variabilidade genética envolvida em surtos de intoxicações estafilocócicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos em formas de cachos de uva Gram-positivos, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5µm, anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos; (DOWNES; ITO, 2001). São encontrados facilmente em pelos, pele, boca, nariz, glândulas mamárias e trato respiratório do homem e animais.

Entre os micro-organismos de interesse em alimentos, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes aqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2004). Dentre os agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, destaca-se o *Staphylococcus aureus* (STAMFORD et al., 2006).

As espécies de *Staphylococcus* são encontradas naturalmente na pele e nas mucosas dos animais de sangue quente e humanos, e são também frequentemente isolados de uma grande variedade de alimentos como carne, queijo e leite; além de fontes como solo, areia e água (HEIKENS et al., 2005). O *S. aureus* é também um dos principais agentes da mastite bovina, contaminando o leite na sua obtenção. Os estafilococos são frequentemente associados a casos de intoxicação alimentar em todo o mundo devido à capacidade de algumas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas. Os principais sintomas da intoxicação estafilocócica são náuseas, vômito, câibras abdominais e diarreia (SANTANA et al., 2006).

Os principais alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica são o leite, creme, queijo, carne cozida, frango, presunto, batata e saladas de batata e atum (JAY, 2005), carne e derivados, saladas, cremes e produtos de confeitaria e derivados lácteos, sendo que muitos desses itens são contaminados durante o preparo em casa ou em restaurantes e armazenados em condições inadequadas de temperatura (LANCETTE; TATINI, 2001).

A primeira associação de *Staphylococcus* com doenças transmitidas por alimentos ocorreu em 1884, quando o micro-organismo foi isolado em queijos envolvidos em surto alimentar (BENNETT, 2005).

Os estafilococos coagulase positiva são os principais produtores de enterotoxinas nos alimentos. Entretanto, também algumas espécies de estafilococos coagulase negativa têm sido estudadas para averiguar sua relação com a produção de enterotoxinas (CUNHA et al., 2006).

Os *S. aureus* são produtores de várias enzimas como coagulase, termonuclease e hemolisina. São microrganismos mesófilos, que crescem numa faixa de temperatura entre 7 e

48°C, apresentando temperatura ótima entre 20 e 37°C. Crescem em atividade de água em torno de 0,86 e pH 4,8 (JAY, 2005).

Entre as 40 espécies e 24 subespécies de estafilococos (EUZÉBY, 1997), apenas 7 são capazes de produzir coagulase livre: *S. aureus*, *S. hyicus* (algumas cepas), *S. intermedius*, *S. schleiferi* subesp. *coagulans* e *S. delphini*, *S. lutrae* e *S. pseudointermedius* (FRENEY et al., 1999). Destas sete espécies, apenas três (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar (GANDRA, 2006). Em função disso e da grande semelhança fenotípica entre estas três espécies de *Staphylococcus*, houve uma mudança nos padrões sanitários da legislação brasileira, estabelecidos tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS), quanto pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente são estipulados limites de tolerância para a presença de estafilococos coagulase positiva (ECP) em alimentos, enquanto no passado eram estipulados parâmetros para *S. aureus*.

Apesar disso, já foi comprovada a existência de cepas de *S. aureus* coagulase negativa (MATTHEWS et al., 1997) e de *S. hyicus* com produção variável de coagulase (KLOOS; BANNERMAN, 1999), fatos que permitem a ocorrência de resultados falso negativos quando da utilização isolada do teste da coagulase livre para identificação desses patógenos em amostras de alimentos.

As espécies *S. hyicus* e *S. intermedius* são mais relacionadas à doenças veterinárias. O *S. hyicus*, que apresenta cepas coagulase variável é relatada como principal causador da epidermite exudativa em suínos (WEGENER; ANDRESEN; BILLE-HANSEN, 1993). No entanto, há relatos de isolamento de *S. hyicus* em casos de mastite subclínica em vacas (CAPURRO et al., 1999) e em casos de dermatite em frangos (KIBENGGE; ROOD; WILCOX, 1983). Segundo Watts e Owens (1989) e Bandeira (2001), *S. hyicus*, juntamente com *S. aureus* é, muitas vezes, a bactéria predominantemente encontrada em rebanhos leiteiros com problemas de mastite.

De acordo com Jay (1994), *S. intermedius*, assim como *S. aureus*, apresenta a capacidade de produzir enterotoxinas. Este micro-organismo tem sido relacionado a vários surtos de intoxicação alimentar, principalmente em produtos de origem animal (KHAMBATY et al., 1994; WADENESH et al., 1995). Segundo Jay (2005), a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas e/ou espécies de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease. Entretanto, algumas cepas e/ou espécies não produtoras dessas enzimas podem produzir enterotoxinas.

2.2 Enterotoxinas estafilocócicas (SE)

As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de proteínas simples com baixo peso molecular (27.000 a 34.000 Da), que são produzidas durante todas as fases do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a metade para o fim da fase exponencial. Elas são resistentes à ação de enzimas proteolíticas como a pepsina e tripsina, e relativamente estáveis ao aquecimento (SORIANO et al., 2002). São ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, apresentando duas cisteínas formando ponte dissulfeto. Apresentam resistência à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo, dessa forma, ativas após a ingestão, além de serem hidrossolúveis. Outra característica importante envolve a termoestabilidade, pois essas enterotoxinas são capazes de resistir aos tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização do leite (LE LOIR et al., 2003).

A produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas e/ou espécies de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease (JAY, 1994). Entretanto, algumas cepas e/ou espécies que não produzem coagulase e/ou termonuclease podem produzir enterotoxinas.

Elas são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de sua descoberta (FREITAS, 2005). O número de enterotoxinas tem aumentado pela detecção de novos genes e, até o momento, já foram identificados 18 tipos distintos, mas com similaridade na estrutura e sequência (BORGES et al., 2008). Os tipos antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas são denominados por SE agregado da letra correspondente à sua descoberta. Segundo Bergdoll (1990), as enterotoxinas mais importantes são SEA, SEC, SEB, SED e SEE, na ordem decrescente de ocorrência. Recentemente outros 13 tipos foram identificados: SEH, SEG, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (BORGES et al., 2008). Segundo Freitas 2005, as enterotoxinas são similares quanto a sua composição e atividade biológica, mas são identificadas separadamente baseadas nas diferenças antigênicas.

Além de todas estas enterotoxinas, existe uma toxina previamente denominada enterotoxina F, que atualmente é conhecidamente responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) (FORSYTHE, 2002).

A ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas tem sido constatada com frequência em produtos lácteos, especialmente em queijos, envolvidos ou não em surtos e casos esporádicos de intoxicação (NORMANNO et al., 2005). A população de *S. aureus* necessária para o início da produção de enterotoxinas é elevada: 10^5 UFC/g, segundo Almeida e Franco (2003) ou 10^6 UFC/g conforme Adesiyun et al. (1998).

Tanto o crescimento de *S. aureus* quanto a produção de enterotoxinas são afetados por parâmetros como temperatura, pH, atividade de água (Aw), concentração de cloreto de sódio (NaCl) e disponibilidade de oxigênio (BORGES et al., 2008). Segundo Arruda (2006), as enterotoxinas são produzidas na faixa de 10° a 46°C, dependendo da associação com outros parâmetros que devem ser ótimos para o desenvolvimento. A faixa de pH que permite o desenvolvimento de estafilococos varia entre 4,2 e 9,3, porém o pH ideal varia entre 7 e 7,5 (SANTANA et al., 2010). Segundo Santana et al. (2010), os estafilococos são capazes de sobreviver e se multiplicar em concentrações de cloreto de sódio de até 15%, e a produção de enterotoxinas pode ocorrer em concentrações de até 10%. Os estafilococos são capazes de crescer a partir de uma atividade de água (Aw) 0,85 (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1996).

Rosec e Gignaud (2002) isolaram 332 cepas de alimentos contaminados na França e encontraram alta incidência de toxinas clássicas (30%) e toxinas SEG, SEH, SEI e SEJ (60%).

Na maioria dos casos a intoxicação estafilocócica não é notificada aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que leva à subnotificação da doença. Por se tratar de uma moléstia de curso rápido (24-48 horas), geralmente os indivíduos afetados não necessitam de atendimento médico (BORGES et al., 2008). Os principais sintomas da intoxicação estafilocócica são náuseas, vômito, câibras abdominais e diarreia. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, sendo em média entre 2 a 4 horas (LE LOIR et al., 2003) e a recuperação completa entre 1 e 3 dias (SU; WONG, 1997). A ação emética é a mais comum, e segundo Dinges et al. (2000), os receptores para as enterotoxinas estão localizados nas vísceras abdominais, principalmente no intestino. Dessa forma, o estímulo é transferido pelo nervo vago ao centro do vômito ocasionando a retroperistalsia do intestino e estômago, culminando em episódios de vômito. A ação diarreica é a segunda mais comum, mas seu mecanismo ainda não é bem esclarecido, porém acredita-se numa inflamação e irritação da mucosa gastrointestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Apesar de *S. aureus* ser destruído através de tratamentos térmicos convencionais, a simples presença do micro-organismo no alimento indica contaminação proveniente de manipuladores através da pele, nariz e boca. Essa contaminação pode ser introduzida diretamente no alimento através de lesões de pele e infecções respiratórias, causadas pelo *S. aureus* em contato direto da pele lesionada ou através de espirro e tosse (BENNETT, 2005).

De acordo com Borges et al. (2008), uma vez que as enterotoxinas estafilocócicas estejam presentes no leite cru, elas não são inativadas pelo processo térmico de pasteurização, e

permanecem no leite pasteurizado, na coalhada e consequentemente no queijo, tornando-o um risco à saúde do consumidor.

De um modo geral, a presença elevada de micro-organismos encontrada em alimentos demonstra possíveis falhas durante o processamento, como, por exemplo: contaminação proveniente dos manipuladores, tratamento térmico ineficiente, má qualidade da matéria prima, contato do alimento com superfícies não sanitizadas ou utilização de temperaturas impróprias para a conservação do produto.

Ferramentas como as Boas Práticas de Higiene (BPH) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), quando utilizadas de forma adequada, podem auxiliar na prevenção de contaminação no fluxo de produção de uma indústria de alimentos (BARRETO; STURION, 2010).

2.3 *Staphylococcus spp* em leite e derivados

O *S. aureus* é sem dúvida, a espécie de *Staphylococcus* mais relacionada a casos de intoxicação alimentar. Eles são considerados os agentes mais importantes na epidemiologia das mastites em vacas de leite e o patógeno mais abundante em leite cru (AARESTRUP et al., 1995). Embora possa já estar presente no leite cru, a detecção de *S. aureus* em queijos elaborados com leite pasteurizado é fruto de sua contaminação posterior, pois o tratamento térmico é eficiente em eliminar células viáveis dessas bactérias (HALPIN-DOHNALEK, MARTH, 1989). Dessa forma, sua presença em alimentos processados é interpretada como indicativa de contaminação dos manipuladores, bem como de limpeza e sanificação inadequadas de superfícies e de utensílios, materiais e equipamentos (ICMSF, 1985; SIQUEIRA, 1995). Novak (1999) relata que *S. aureus* enterotoxigênicos podem ser carregados para os alimentos, durante ou após o processamento, através do manuseio inadequado e que a refrigeração insuficiente, pode possibilitar o crescimento do micro-organismo e a produção e liberação de enterotoxinas no alimento.

Dentre os produtos lácteos produzidos no Brasil, o mais consumido é o queijo. Sua produção aumentou de cerca de 400 mil toneladas no ano 2000 para cerca de 750 mil toneladas do ano de 2010 (ABIQ, 2012).

Segundo Feitosa et al. (2003), o queijo é o produto lácteo mais associado a surtos alimentares por se caracterizar como um excelente veículo de patógenos. Especialmente os queijos frescos produzidos artesanalmente apresentam esse risco, pois são elaborados a partir do leite cru e não passam pelo processo de maturação, como outros queijos. A contaminação

microbiana afeta não só a saúde do consumidor como também a indústria, pelas perdas econômicas resultantes da alteração físico-química do leite que gera alterações tecnológicas nos futuros produtos lácteos.

Há diversos relatos sobre a incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em populações superiores ao limite estabelecido pela RDC n. 12 (ANVISA, 2001). Vários trabalhos sobre a incidência de estafilococos coagulase positiva em queijo Minas frescal mostram contagens acima dos valores máximos tolerados pela legislação vigente (ANVISA, 2001), que são de 10^3 UFC/g de ECP em queijos de umidade muito alta (55%), elaborados com bactérias lácticas abundantes e viáveis; e de 5×10^2 UFC/g no caso de queijos de umidade muito alta elaborados por coagulação enzimática sem a ação de bactérias lácticas.

Em estudo realizado por Santos et al. (2008), de 16 amostras de queijo Minas frescal analisadas quanto à contagem de estafilococos coagulase positiva, 87,5 % delas apresentaram valores acima do permitido pela legislação. Leite et al. (2005) também obtiveram a maior parte das amostras (86,7%) de queijo tipo Minas frescal em Cuiabá apresentando contagem acima dos padrões estabelecidos pela legislação para estafilococos coagulase positiva.

Loguercio e Aleixo (2001) encontraram 43,3% das amostras de queijo tipo Minas frescal classificadas como potencialmente perigosos em causar doenças transmitidas por alimentos por apresentarem contagens de estafilococos coagulase positiva acima do tolerado pela legislação. Silva (2008) encontrou contagens de log 6,40; 6,58 e 6,76 ufc/g em queijos do tipo Minas frescal produzidos e comercializados no estado do Rio de Janeiro, valores estes bem acima do tolerado na legislação, reforçando a falta de cuidados higiênicos durante a cadeia de produção dos queijos e representando risco ao consumidor pela possibilidade da presença de enterotoxinas estafilocócicas.

Em outro estudo, Komatsu et al. (2010) encontraram 88% das amostras (44/50) analisadas de queijos tipo Minas frescal artesanais em Uberlândia-MG fora dos padrões estabelecidos na legislação vigente.

Borges et al. (2008) avaliaram a contaminação de ECP em linha de produção de queijo coalho e encontraram populações variando entre $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹ no leite cru, <1UFC/mL nas amostras de leite pasteurizado e de <1 UCF/g a $2,0 \times 10^2$ UFC/g nas amostras de queijo, sendo os ECP detectados em 100% (25/25) das amostras de leite cru e em 8% (2/25) das amostras de queijos. Das 12 espécies identificadas nas amostras, nove eram coagulase negativa e três coagulase-positiva (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*). Os autores também detectaram a presença de enterotoxina estafilocócica em 20% das amostras de leite cru que, pela sua termo-estabilidade, também foi encontrada no leite pasteurizado, na

coalhada e no queijo produzido, mostrando que a disseminação da contaminação de ECP e a presença de enterotoxina na linha de produção do queijo provavelmente se deva a falhas na aplicação das Boas Práticas de Fabricação desde a obtenção da matéria-prima até a produção final do queijo.

2.4 Métodos de detecção de *Staphylococcus* spp e enterotoxinas

As enterotoxinas, por serem proteínas simples, são incapazes de ser detectadas por métodos químicos, por isso os métodos biológicos, imunológicos e moleculares são os mais utilizados (BERGDOLL et al., 1973). Segundo Santilano et al. (2011), os ensaios imunológicos são mais sensíveis e específicos, além disso, são a base para detecção das enterotoxinas identificadas sorologicamente. De acordo com Lancette e Tatini (2001), a maior dificuldade encontrada na identificação de enterotoxina estafilocócica em alimentos é a pequena quantidade presente no alimento envolvido.

Os métodos biológicos de detecção de enterotoxinas geralmente utilizam macacos, gatos e cobaias, que recebem aplicações intragástricas de amostras supostamente contaminadas por enterotoxinas, medindo-se a atividade emética nos animais (SANTILIANO, 2011). Entre as desvantagens podemos citar a incapacidade de diferenciar as toxinas, dificuldade de manutenção dos animais (BERGDOLL et al., 1973), variação na sensibilidade, desenvolvimento de resistência em animais a repetidas administrações e alto custo dos ensaios (SANTILIANO, 2011).

Dentre os métodos imunológicos incluem-se ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA), imunodifusão e aglutinação em látex, e métodos moleculares como Western Blot e reação em cadeia da polimerase (PCR) (SANTILIANO 2011). Os métodos de imunodifusão tradicionais, os quais são baseados na capacidade de interação da enterotoxina (antígeno) com anticorpos policlonais específicos, formando um precipitado, são testes com pouca sensibilidade, se considerarmos que muitas cepas de estafilococos produzem enterotoxinas em quantidades inferiores a 1ng/mL (TEVA et al., 2010).

Atualmente, existem métodos mais sensíveis e com resultados mais rápidos para a detecção de SE, que permitem detectar níveis próximos a 0,1-1,5 ng/mL. Dentre estes, os mais conhecidos são o método por aglutinação reversa passiva em látex (RPLA) e o método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), havendo inclusive no mercado kits para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, como o SET-RPLA (Oxoid) e o VIDAS-SET2 (bioMérieux), este último através de Enzyme Linked Fluorescent Imunoassay (ELFA),

um imunoenensaio similar ao ELISA, mas com maior sensibilidade devido à presença do substrato 4-metil-umbeliferil-fosfato, que, após ser hidrolisado pela fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona e emite fluorescência captada e mensurada por um equipamento específico do mesmo fabricante (LEITE, 2005). O kit VIDAS-SET2 apresenta a limitação de não detectar qualitativa e quantitativamente, identificando presença ou ausência das toxinas clássicas.

Diversos métodos moleculares podem ser utilizados para detecção de estafilococos e suas enterotoxinas, entre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica *Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR). A técnica denominada reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi concebida em 1983 por Kary Mullis (FREITAS, 2005) e, segundo Singh et al (2001), além da detecção de micro-organismos, a PCR é eficiente também na detecção de genes codificadores de fatores de virulência, na caracterização interespecíes e em estudos taxonômicos e de epidemiologia molecular.

A técnica de PCR, ao tornar possível localizar um pequeno fragmento de DNA numa complexa mistura de moléculas mais ou menos fragmentadas e replicá-lo milhões de vezes, permitindo a sua posterior identificação, tem contribuído para a identificação de espécies componentes em diferentes produtos alimentares, inclusive no leite e no queijo (VELOSO et al., 2002).

Esse método é amplamente utilizado para detecção dos genes codificadores de enterotoxinas, entretanto não significa que haverá expressão gênica (SASAKI et al., 2005). A maior vantagem desse método é possuir alta sensibilidade e precisão, mesmo quando são testadas amostras com baixa concentração de micro-organismos (SANTILIANO et al., 2011).

A PCR tem sido muito utilizada em diagnósticos microbiológicos pela sua rapidez, alta seletividade, bom limite de detecção e potencial para otimização (FREITAS, 2005). Contudo, o alto custo em investimentos tecnológicos, assim como a necessidade de aprovação oficial e instruções padronizadas, impedem que seja utilizada em alguns casos (MALORNY et al., 2003).

Uma variante, segundo Alves et al (2003), é a técnica do ERIC-PCR, baseada no uso de *primers* complementares às sequências de DNA repetitivas, presentes em múltiplas cópias do genoma. Estas sequências encontram-se em regiões genômicas distintas ou em posições intergênicas diferentes. O *Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) são sequências caracterizadas como palíndromos invertidas que ocorrem em múltiplas cópias no genoma de bactérias (WILSON & SHARP, 2006). Segundo Versalovic et al (1991) essas

sequências estão presentes na maioria das espécies de eubactérias, mas cada uma apresenta uma frequência e uma organização diferente.

A utilização de técnicas que evidenciam o padrão de bandas (*fingerprinting*) do micro-organismo de interesse é de grande utilidade para a Saúde Pública, pois correlaciona dados epidemiológicos de forma mais precisa. Dessa forma a caracterização de cepas por esse método torna-se importante na avaliação da diversidade genética dos isolados, auxiliando na elucidação de surtos (MATTOS, 2005).

Pesquisadores utilizaram ERIC-PCR como ferramenta de diferenciação entre espécies de *Pseudomonas* (LOWS et al, 1994), *Shigella* (LIU et al, 1995), *Listeria* (JERSEK et al, 1996), *Brucella* (TCHERNEVA 1996), *Babesia bigemina* (MADRUGA et al, 2002), *Bartonella* (RODRIGUEZ-BARRADAS et al, 1995), *S.aureus* (MATTOS, 2005) e *Leishmania* (LEAL, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Análises fenotípicas e genotípicas, descritas a seguir, foram realizadas para o isolamento e identificação de estafilococos coagulase positiva.

3.1 Caracterização do universo amostral

As coletas das amostras foram realizadas em 3 laticínios (A, B e C) produtores de queijo Minas frescal, no Estado de São Paulo. As amostras foram obtidas de distintos pontos de amostragem na linha de processamento dos queijos e seguindo o plano de amostragem conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Plano de amostragem

Amostragem	Coletas (Anos de 2012-2013)												Total
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	
Laticínio	A	A	A	A	B	B	B	B	C	C	A	A	
Silo de leite cru (leite cru)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	24
Pasteurizador (leite pasteurizado)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Tanque de coagulação	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Liras	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	24
Coalhada	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Formas	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Mesa de dessoragem	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Salmoura	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	06
Pisos	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	24
Manipuladores	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	24
Queijos antes embalagem	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
Embaladeira	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Queijos embalados	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
Nº Amostras/laticínio/visita	25	25	25	25	24	24	24	24	24	24	25	25	
TOTAL DE AMOSTRAS:													296

Foram programadas 4 coletas em cada laticínio, mas em razão do laticínio C ter encerrado sua produção durante a pesquisa, as duas restantes foram realizadas no primeiro laticínio (A), para fechar o plano de coletas.

As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos e conservadas com gelo reciclável até a chegada ao laboratório e análise imediata.

Os laticínios apresentavam as seguinte características:

- Laticínio A: com captação de aproximadamente 20 mil litros de leite/dia, produção semanal de cerca de 600 kg de queijo Minas frescal, sendo 250kg/lote. A pasteurização do leite era realizada em pasteurizador de placas High Temperature Short Time (HTST), a 73°C por 15 s.
- Laticínio B: captação diária de aproximadamente 800 litros de leite, produção semanal de queijo Minas frescal era de aproximadamente 150 kg, sendo 50kg/lote. A pasteurização realizada era a 65°C/30 min.
- Laticínio C: assemelhava-se a granja leiteira conforme a IN 62 (BRASIL, 2011), produzia seu próprio leite, com produção diária de aproximadamente mil litros de leite/dia, beneficiando-o logo após a ordenha das vacas, em sistema de pasteurização rápida. A produção semanal de queijo Minas frescal era em torno de 400 kg, elaborados em um único lote.

3.2 Análises Laboratoriais

3.2.1 Identificação e isoamento de *Staphylococcus spp* coagulase positiva

Uma porção de 25 g de cada amostra sólida foi pesada e diluída em 225 mL de água peptonada 0,1%, já as amostras líquidas foram diluídas na proporção de 1 mL de amostra para 9 mL de água peptonada 0,1%. Após a diluição decimal seriada, foi inoculado em placas contendo meio Baird Parker Agar (BPA-Difco) enriquecido com solução de gema de ovo com telurito de potássio (Laborclin), alíquotas de 0,3 mL em 3 placas e 0,1 mL em 1 placa da diluição correspondente. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (LANCETTE; TATINI, 2001).

Após 48 horas de incubação, as placas foram submetidas a contagem e até 20 colônias de cada amostra foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI-Difco). Esse tubo foi então, incubado em estufa a 37°C por 24 horas e, em seguida, 1 µL da cultura foi estriada com alça calibrada em placas contendo Agar Soja Triptona (TSA-Difco) e incubadas a 37°C por 48 horas. De posse dessas culturas puras, a última colônia obtida pelo estriamento foi transferida para tubos contendo caldo BHI e incubada novamente a 37°C por mais 24 horas, a fim de dar prosseguimento aos testes de identificação dos estafilococos coagulase positiva.

3.2.2 Testes fenotípicos

As culturas obtidas foram analisadas fenotipicamente com os seguintes testes: coloração de Gram, coagulase e catalase, conforme descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (LANCETTE; TATINI, 2001).

Após a confirmação fenotípica das culturas puras como estafilococos coagulase positiva, as mesmas foram armazenadas em Caldo Soja Triptona (TSB-Difco) adicionado de glicerol, em freezer a -18°C para posteriores análises genotípicas.

3.3 Análises genotípicas

As cepas-padrão utilizadas nas análises moleculares foram importadas da *American Type Culture Collection* (ATCC-EUA), compreendendo: *S. hyicus* ATCC 11249 e *S. intermedius* ATCC 29663. A cepa de *S. aureus* ATCC 25923 já fazia parte da coleção do Laboratório de Higiene e Laticínios.

3.3.1 Reativação das culturas

As cepas congeladas foram reativadas em caldo BHI por três repicagens consecutivas a 37°C por 24 horas, visando obter uma contagem bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

3.3.2 Extração de DNA pelo Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”

Após a obtenção do *pellet* de células a extração foi realizada conforme recomendações do fabricante. Os DNAs extraídos foram armazenados em tampão TE (AxyPrep™) em freezer a -18°C.

3.3.3 Amplificação de fragmentos do gene *nuc* específico para *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*

A metodologia e os *primers* (Tabela 2) utilizados para amplificação do gene *nuc* foram descritos por Sasaki et al. (2010).

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados na identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, produtos de amplificação e espécie correspondente

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Produto de amplificação (pb)	Espécie
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC		
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC		
in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430	<i>S. intermedius</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC		

As reações de amplificação foram realizadas contendo tampão para a reação PCR 1X, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 2,0 mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerase, 1µL de DNA molde, 5 pmol de cada um dos 6 *primers* (Tabela 3), água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL.

A reação foi realizada em termociclador C1000 (Bio-Rad, Hércules, EUA) nas condições recomendadas por Sasaki et al. (2010): 94°C/2 min, 30 ciclos 95°C/30 seg, 56°C/35 seg e 72°C/1 min; extensão final de 72°C/7 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato). O padrão aplicado apresentou peso molecular de 100 pb (Promega).

3.3.4 Amplificação de genes SE envolvidos na síntese de enterotoxinas

A detecção dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ das cepas isoladas foi realizada de acordo com Rall et al. (2008). Após a extração do DNA as amplificações foram realizadas em diferentes reações utilizando os *primers* específicos (Tabela 3). Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato). O padrão de peso molecular de 100 pb (Promega) foi utilizado.

Tabela 3 - Primers utilizados para a identificação de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas estafilocócicas

Primer	Produto de amplificação (pb)	Temperatura/tempo de anelamento (°C/min) e ciclos	MgCl ₂	Referência
SEA-1 TTGGAAACGGTTAAAACGAA SEA-2 GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	54°C/1 min – 30 ciclos	2,0 mM	Johnson et al. (1991)
SEB-1 TCGCATCAAACGTGACAAACG SEB-2 GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	54°C/1 min – 30 ciclos	1,0 mM	Johnson et al. (1991)
SEC-1 GACATAAAAGCTAGGAATTT SEC-2 AAATCGGATTAACATTATCC	257	53°C/2 min – 35 ciclos	1,5mM	Johnson et al. (1991)
SED-1 CTAGTTTGGTAATATCTCCT SED-2 TAATGCTATATCTTATAGGG	317	54°C/1 min – 30 ciclos	0,75mM	Johnson et al. (1991)
SEE-1 AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC SEE-2 CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	54°C/1 min – 30 ciclos	0,75mM	Mehrota et al. (2000)
SEG-1 AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC SEG-2 AGAACCATCAAACCTCGTATAGC	287	54°C/1 min – 30 ciclos	2,0 mM	Omoe et al. (2002)
SEH-1 GTCTATATGGAGGTACAACACT SEH-2 GACCTTTACTTATTTGCTGTC	213	55°C/1 min – 35 ciclos	2,0mM	Omoe et al. (2002)
SIE-1 GGTGATATTGGTGTAGGTAAC SIE-2 ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	454	56°C/2 min – 35 ciclos	0,75Mm	Omoe et al. (2002)
SEJ-1 CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG SEJ-2 CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	64°C/2 min – 35 ciclos	2,5mM	Nashev et al. (2004)

As reações de amplificação dos fragmentos dos genes que codificam para enterotoxinas foram realizadas contendo tampão para a reação PCR 1X, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 1U de Taq Polimerase (GoTaq[®] Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 1 µL de DNA molde, 10 pmol de cada *primer*, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A concentração de MgCl₂ variava e pode ser observada na Tabela 3.

As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 94°C/5 min de desnaturação inicial, 94°C/2 min desnaturação, temperatura de anelamento e a quantidade de ciclos variavam de acordo com o primer (Tabela 3), 72°C/1 min de extensão; extensão final de 72°C/5 min.

3.3.5 Tipagem das cepas de *Staphylococcus spp.* coagulase positiva por ERIC-PCR

O DNA de 102 isolados foi analisado através da técnica ERIC-PCR. Utilizou-se os *primers* ERIC1R e ERIC2, descritos por Versalovic et al. (1991), conforme Tabela 4. As reações de amplificação foram realizadas contendo tampão para reação PCR 1X, 0,2 mM de cada desoxinucleotideo (dNTP), 3 mM MgCl₂, 1U de Taq Polimerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 1 µL de DNA molde, 10 pmol de cada um dos 2 *primers*, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL.

Todas as amplificações foram conduzidas em termociclador, programado para um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, trinta ciclos de desnaturação a 92°C por 45 segundos, anelamento a 40°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 10 minutos e um ciclo final de extensão a 70°C por 20 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por um período de 8 horas à intensidade de corrente de 45V. Os géis foram fotografados pelo transluminador e as imagens então visualizados pelo programa “Image Lab Software” do “Molecular Imager Gel DocTM XR” (BioRad®). Os tamanhos dos produtos foram determinados pela comparação ao padrão de migração eletroforética de um marcador de tamanho molecular de 1 kb (Promega®).

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados na tipagem das cepas de *Staphylococcus spp*

<i>Primer</i>	Sequência
ERIC1R	3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATTGA-5'
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Os perfis obtidos pela técnica de ERIC-PCR foram analisados e agrupados com a utilização do *software* Bionumerics versão 6.0.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) para a comparação do padrão de bandas, utilizando-se o coeficiente de Pearson.

3.4 Análises imunoenzimáticas

3.4.1 Detecção de enterotoxinas em meio de cultura de cepas puras e em amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijo Minas frescal

Cada cepa isolada portadora de pelo menos algum dos genes relacionados à produção de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) foi submetida ao teste de detecção de enterotoxinas pelo sistema VIDAS® Staph Enterotoxin II (VIDAS SET2) da BioMérieux®. Todas as amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijo Minas frescal também foram submetidas ao mesmo teste.

As cepas foram reativadas seguindo Bergdoll (1965) com algumas modificações. As amostras foram inoculadas em caldo BHI, incubadas a 37°C por 24 horas, depois foram estriadas em placa com Baird Parker Agar, incubadas a 37°C por 48 horas. Após isso 7 colônias de cada cepa foram incubadas em 50 mL de BHI a 37°C por 24 horas sob agitação a 250 rpm. Após essa incubação foram centrifugadas a 3.000 – 5.000g por 15 minutos, filtradas com algodão hidrófilo e pipetado 500µL, conforme recomendação do protocolo de extração da BioMérieux®.

As amostras de leite e queijo foram submetidas a extração seguindo o protocolo de extração de produtos lácteos da BioMérieux®. Todas as etapas do teste foram realizadas automaticamente no aparelho e terminado o teste, o resultado foi calculado automaticamente pelo sistema, que forneceu um valor de teste para cada amostra. Este valor é comparado com referências internas (limiares) e cada resultado foi interpretado como positivo ou negativo, relatando apenas presença ou ausência da toxina, sem padrões qualitativos e quantitativos para a mesma. As análises do VIDAS® Staph Enterotoxin II foram realizadas no Laboratório de Toxinas Microbianas na Unicamp/SP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência e contagens de estafilococos coagulase positiva

Nos três laticínios pode-se perceber que o leite cru é uma importante via de entrada dos estafilococos coagulase positiva, com contagens variando entre log 4,21 e log 6,20 no laticínio A, log 4,02 e log 6,22 no laticínio B e log 3,05 e log 4,36 no laticínio C (Tabela 5).

Tabela 5 – Contagem de estafilococos coagulase positiva (log UFC/mL) em leite cru e pasteurizado em laticínios produtores de queijo Minas frescal

Laticínio	Coletas											
	1		2		3		4		5		6	
	LC ¹	LC ²	LC ¹	LC ²	LC ¹	LC ²	LC ¹	LC ²	LC ¹	LC ²	LC ¹	LC ²
A	6,20	5,37	5,27	5,33	5,27	4,21	5,56	5,07	5,26	5,57	5,49	5,81
B	6,22	5,74	5,37	4,02	4,16	4,17	4,18	5,84	NR	NR	NR	NR
C	3,30	3,43	4,36	3,05	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	LP		LP		LP		LP		LP		LP	
A	ND		1,07		ND		ND		2,82		2,07	
B	ND		ND		0,3		ND		NR		NR	
C	ND		0,6		NR		NR		NR		NR	

^{1,2} LC= Leite cru; NR: Não realizado; LP= Leite pasteurizado; ND: < 1,0; não detectado.

Observa-se na Tabela 5 que o risco é real, pois muitas das contagens no leite cru estão acima do limite máximo de tolerância microbiológica, log 3 UFC/g (BRASIL, 1996; ANVISA, 2001) e dentro do necessário para a ocorrência de surtos, que é entre log 5 e log 6 UFC/g ou mL (ADESIYUN et al., 1998; ALMEIDA; FRANCO, 2003).

Esses resultados indicam contaminação proveniente de fatores como: altos índices de mastite bovina nos rebanhos, condições precárias de higiene nas práticas de ordenha e armazenamento, transporte do leite cru em temperaturas inadequadas favorecendo a multiplicação microbiana, acarretando dessa forma uma má qualidade da matéria prima.

Além desses fatores, no laticínio B o leite cru recebido não era refrigerado após a ordenha, e ao chegar ao laticínio era transferido imediatamente para um tanque de expansão, aonde uma parte era destinada a produção imediata de um lote de queijo e a parte restante mantida resfriada para fabricações posteriores de queijo no mesmo dia. O leite contido no tanque de

expansão era transferido ao tanque de coagulação através de latões e submetido à pasteurização lenta (65°/30 min), com a temperatura sendo controlada por um termômetro flutuante. Contudo, o leite permanecia em repouso por todo o período da pasteurização, o que impedia que o calor fosse distribuído igualmente.

Nos laticínios A e B a heterogeneidade do rebanho também contribui para essa contaminação. No laticínio C, a produção era local e provinha de um único rebanho, com o leite recém-ordenhado chegando ao beneficiamento por meio de um sistema de tubulação fechada, isso pode reduzir os índices de contaminação por estafilococos. Contudo, as contagens de ECP foram ainda elevadas, em torno de 3 log UFC/mL, já denotando problemas higiênico-sanitários na ordenha e rebanho.

Tratando-se de estafilococos é importante prevenir a contaminação do leite cru, pois mesmo que haja destruição do micro-organismo, a presença da enterotoxina produzida antes do processamento pode causar danos à saúde do consumidor, e essa população, de log 5 UFC/mL (ALMEIDA & FRANCO, 2003) foi atingida em várias das amostras de leite cru, conforme Tabela 5.

Borges (2006) detectou enterotoxina estafilocócica no leite cru e no leite pasteurizado, em laticínios, usados na fabricação de queijo coalho. As contagens de ECP no leite cru recebido pelos laticínios apresentavam risco direto ao consumidor pela constatação desses micro-organismos após a pasteurização nos três laticínios.

As contagens de ECP no leite cru dos três laticínios foram compatíveis com resultados de outras pesquisas: Gomes e Gallo (1995): log 3,08 a log 5,87 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* na região de Campinas/SP; Borges et al. (2008): 3,90 a log 6,70 UFC/mL, e com presença em 100% das 25 amostras de leite cru. Nesse estudo houve presença de enterotoxinas estafilocócicas em 20% das amostras de leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo pronto. Os padrões sanitários brasileiros não preveem contagem de ECP (ANVISA, 2001; BRASIL, 2011) para leite cru, porém a IN 62/2011 (BRASIL, 2011) exige para uma contagem de microrganismos mesófilos de log 5,47 UFC/mL e sendo o *Staphylococcus* pertencente ao grupo dos mesófilos, em muitas coletas a contagem foi superior a esse valor.

As amostras de leite pasteurizado (72°C/15s) dos três laticínios apresentaram contagens de estafilococos (Tabela 5). A população encontrada é preocupante por se tratar de uma análise posterior a um processo que em teoria deveria eliminar 99,5% dos micro-organismos presentes no leite cru, especialmente para o gênero *Staphylococcus*, cujo valor $D_{75^{\circ}\text{C}}$ de *S. aureus* é 0,02 minutos e o $D_{65^{\circ}\text{C}}$ é 0,2 minutos (ICMSF, 1996), o que significa que o binômio tempo/temperatura quando corretamente utilizado seria o suficiente para eliminar as

populações de *S. aureus* mesmo quando em torno de 10^6 UFC/mL, como verificado nas amostras de leite cru dos três laticínios. Dessa forma, a presença do micro-organismo nas amostras de leite pasteurizado é um indicativo de falha no processo, problemas de higienização do equipamento e possível formação de biofilmes nos pasteurizadores, especialmente os de placas, o que pode também ser uma fonte de contaminação.

No laticínio B, o leite era submetido à pasteurização lenta (65°C/30 min), com a temperatura sendo controlada por um termômetro flutuante. Contudo, o leite permanecia em repouso por todo o período da pasteurização, impedindo que o calor fosse distribuído igualmente. A análise microbiológica do leite pasteurizado (coletado diretamente do tanque de coagulação), da terceira coleta, apresentou contagem de log 0,30 UFC/ml de ECP, mostrando que o processo foi falho. Nessa coleta houve ocorrência de uma falha elétrica no pasteurizador, que fez com que o leite ficasse no tanque de coagulação por horas até que o problema fosse resolvido, o que pode justificar sua detecção e ilustra que nos laticínios ocorrem falhas no processo.

Já nas mãos de manipuladores e nas superfícies das paredes, pisos e equipamentos, os resultados evidenciaram ampla disseminação de estafilococos no interior dos três laticínios, (tabelas 6, 7 e 8). O laticínio A foi o que apresentou maiores ocorrências de ECP em seu interior, verificando-se a presença do micro-organismo em todas as superfícies analisadas, exceto na mesa de dessoragem.

O laticínio B registrou presença de estafilococos no tanque de coagulação, manipuladores e piso, e o laticínio C apenas na mesa de dessoragem e no tanque de coagulação. Nos três estabelecimentos as coletas eram realizadas momentos antes do início do processamento dos queijos, de modo que a presença de estafilococos nas superfícies inertes é um indicativo de falhas no processo de higiene. A presença de micro-organismos em equipamentos, como tubulações e até mesmo o tanque, pode ser consequência da formação de biofilmes bacterianos na superfície. Esses biofilmes podem se desprender, em partes, contaminando o produto no decorrer de seu processamento.

Tabela 6 – Contagem de estafilococos coagulase positiva (log UFC/mL) em superfícies e manipulador no laticínio A

Coleta	Tanque		Lira		Manipulador		Mesa	Piso	Embaladeira
1	ND	ND	ND	ND	0,54	ND	ND	ND	ND
2	3,32	ND	ND	ND	1,44	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	0,07	3,36	ND	0,77	ND	ND	1,48	1,73
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,92	ND

ND: < 1,0; não detectado

Tabela 7 – Contagem de estafilococos coagulase positiva (log UFC/mL) em superfícies e manipulador no laticínio B

Coleta	Tanque		Lira		Manipulador		Mesa	Piso	Embaladeira
1	ND	ND	ND	ND	0,3	1,06	0,3	0,3	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: < 1,0; não detectado

Tabela 8 – Contagem de estafilococos coagulase positiva (log UFC/mL) em superfícies e manipulador no laticínio C

Coleta	Tanque		Lira		Manipulador		Mesa	Piso	Embaladeira
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	1,15	ND	ND	ND	ND	ND	0,86	ND	ND

NR: Não realizado; ND: < 1,0; não detectado

Irregularidades foram observadas durante o processamento dos queijos, no Laticínio A verificou-se a presença de massa de queijo ressecada nas paredes do tanque, as formas utilizadas para a enformagem dos queijos eram lavadas com detergente e água e submersas em solução de hipoclorito de sódio 1 mg/L, mas não ficavam totalmente submersas. Numa das coletas, a lira apresentou contagem elevada: log 3,36 UFC/unidade, indicando que as Boas Práticas de Fabricação não eram realizadas da mesma maneira em todos os processamentos.

O laticínio A foi o único laticínio do qual se isolou ECP na embaladeira, que apresentava sujidades nas paredes internas e na superfície onde o queijo era embalado. Segundo informações da funcionária responsável por esse setor, a higienização era feita com um pano úmido e álcool gel, levando-se em conta o aspecto visual, sem regularidade.

As mãos dos manipuladores dos laticínios A e B apresentaram presença para ECP com a contagem variando de log 0,3 UFC/mão a log 1,44 UFC/mão. Esses resultados estão de acordo com vários estudos que apontam que os seres humanos são reservatórios de *Staphylococcus* spp. dentro da indústria de alimentos (ALMEIDA-FILHO; NADER-FILHO, 2000; LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; LEITE et al., 2005; SALOTTI et al., 2006; KOMATSU et al., 2010). Durante o processamento do queijo, os manipuladores entram em contato direto com o alimento, sendo fundamental que apresentem práticas adequadas de higiene, pois figuram como um importante ponto de contaminação.

No laticínio A os manipuladores não utilizavam luvas e circulavam dentro da área de processamento, ingerindo alimentos, falando ao telefone celular à beira do tanque de coagulação, e fumando nas dependências do estabelecimento. No laticínio B manipuladores manuseavam os queijos sem luva e portando anéis e esmalte. No laticínio C os manipuladores estavam vestidos adequadamente, utilizando luvas, touca e máscara, o que pode explicar a não detecção.

A portaria 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta a fixação dos requisitos microbiológicos em queijos (BRASIL, 1996), e a Resolução RDC nº 12, que regulamenta os padrões microbiológicos em alimentos (ANVISA, 2001), estabelecem o limite de tolerância de estafilococos coagulase positiva em queijos Minas frescal elaborados com bactérias lácticas em log 2 UFC/g, sendo aceitável que até duas amostras apresentem contagens de até log 3 UFC/g, obedecendo ao plano de três classes utilizando cinco unidades de amostra.

As análises dos queijos nos laticínios A e B (Tabelas 9 e 10) mostraram que o micro-organismo se dissemina facilmente na linha de produção, devido principalmente às falhas de aplicação das Boas Práticas de Fabricação e Higiene desde a obtenção da matéria prima até o produto final. O laticínio C foi o único que não apresentou contagens para ECP em seus queijos.

Tabela 9 – Contagem de estafilococos coagulase positiva em salmoura (UFC/mL), coágulo (UFC/g) e queijos (UFC/g) antes e após a embalagem do laticínio A

	Coleta					
	1	2	3	4	5	6
Coág.	ND	ND	ND	ND	ND	4,69
Sal.	ND	ND	ND	ND	4,73	ND
QA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QA2	3,24	ND	ND	ND	3,45	ND
QA3	2,52	3,35	ND	ND	3,61	ND
QA4	2,76	5,29	ND	ND	2,69	ND
QA5	2,04	ND	ND	ND	4,13	5,05
QD1	2,11	5,13	ND	ND	3,62	5,54
QD2	2,54	5,46	ND	ND	ND	4,95
QD3	ND	ND	ND	ND	4,02	4,44
QD4	3,31	5,24	ND	ND	ND	ND
QD5	ND	3,9	ND	ND	ND	ND

QA= Queijo antes de embalar; QD= Queijo depois de embalar; Coág.= Coágulo; Sal.= Salmoura; ND= < 1,0; não detectado

Tabela 10 – Contagem de estafilococos coagulase positiva em coágulo (UFC/g) e queijos (UFC/g) antes e após a embalagem do laticínio B

	Coleta			
	1	2	3	4
Coág.	ND	ND	ND	ND
QA1	ND	ND	0,88	ND
QA2	1,23	ND	1,72	5,15
QA3	ND	ND	1,3	4,84
QA4	ND	1,3	ND	5,63
QA5	ND	ND	ND	5,43
QD1	3,41	1,22	1,36	5,14
QD2	2,67	2,47	1,48	4,54
QD3	ND	1,3	1,0	4,81
QD4	3,36	ND	1,73	3,96
QD5	ND	ND	ND	ND

QA= Queijo antes de embalar; QD= Queijo depois de embalar; Coág.= Coágulo; ND= < 1,0; não detectado

Nos laticínios A e C, observou-se ainda populações significativas em amostras de coágulo na sexta (log 4,69 UFC/g) e primeira (log 1,33 UFC/g) coleta, respectivamente. No laticínio A, das seis coletas realizadas, quatro lotes apresentaram contagens acima do tolerado pela legislação para queijos (BRASIL, 1996). Os queijos coletados antes e após a embalagem não apresentaram contaminação nas 3ª e 4ª coletas. Entretanto, na 1ª, 2ª, 5ª e 6ª coletas foi possível observar contagens para estafilococos coagulase positiva, sendo as maiores populações encontradas em queijos embalados da 2ª coleta: log 3,9, log 5,13, log 5,24 e log

5,46 UFC/g., 5ª coleta: variando entre log 2,69 e log 4,13 UFC/g, e 6ª coleta: variando entre log 4,44 e log 5,54 UFC/g.

No laticínio B, amostras de queijo de um mesmo lote apresentaram diferentes populações de estafilococos coagulase positiva. Na 1ª coleta, as 5 amostras de queijo antes da embalagem apresentaram populações variando entre log 2,04 e log 3,24 UFC/g, enquanto que as 5 amostras de queijo após embalagem apresentaram populações variando entre log 2,11 e log 3,31 UFC/g. Essa contaminação heterogênea sugere que partes de leite, coalhada e queijo que ficam diretamente expostas às superfícies contaminadas, como tanque de coagulação e formas, e entram em contato com os manipuladores durante o processamento, favorecem a maior contaminação do produto final. Na 2ª coleta observaram-se novamente grandes diferenças de população entre as amostras de um mesmo lote, apresentando log 5,29 UFC/g e ausência em 1 g em queijos antes da embalagem. Em queijos embalados foi encontrada uma contagem superior à observada nos queijos não embalados.

A expressiva diferença encontrada nas populações desses micro-organismos entre as coletas pode estar relacionada com uma maior contaminação ocorrida em alguns pontos do processamento na segunda coleta, como no leite pasteurizado, no tanque de coagulação, nas formas e manipuladores. Essa diferença evidencia a importância de um processo de higiene e de Boas Práticas de Fabricação adequados ao processamento de alimentos.

No laticínio A, os lotes de queijos da 3ª e 4ª coletas estariam obedecendo à legislação do MAPA e da ANVISA. Entretanto, os lotes de queijos das 1ª, 2ª, 5ª e 6ª coletas não deveriam ser liberados para o comércio devido ao alto índice de contaminação por estafilococos coagulase positivo, o que acarretaria em um aumento do risco de produção de enterotoxinas no produto, aumentando também o risco de ocorrência de surtos de intoxicação alimentar.

No Laticínio B, os lotes de queijos da 1ª, 2ª e 4ª coletas estavam fora dos padrões microbiológicos exigidos pela Portaria 146 (BRASIL, 1996), sendo que apenas os da 3ª coleta encontrava-se dentro desses padrões. A referida legislação prevê limites de estafilococos coagulase positiva em queijos de muito alta umidade com tolerância de log 2 a log 3 UFC/g no plano de 5 classes, sendo aceitável até 2 amostras apresente população de log 3 UFC/g.

Na literatura encontramos inúmeros relatos sobre a ocorrência de estafilococos coagulase positiva em números superiores ao tolerado pela legislação. Santos et al. (2008) analisaram 16 amostras de queijo Minas frescal quanto a contagem de estafilococos coagulase positiva, sendo que 87,5% apresentaram valores acima do tolerado pela legislação. Leite et al. (2005) também encontraram 86,7% de queijos Minas frescal apresentando contagem acima do estabelecido pela legislação para estafilococos coagulase positiva. Silva (2008) encontrou

contagens de 6,40; 6,58 e 6,76 log de UFC/g em queijos Minas frescal produzidos e comercializados no Estado do Rio de Janeiro. Komatsu et al. (2010) encontraram 88% das 50 amostras de queijo Minas frescal fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Isso denota que as condições higiênicas utilizadas durante a produção de queijos no Brasil encontram-se ainda muito precárias.

As amostras de queijo do laticínio C não apresentarem contagens para ECP não significa que o risco para o consumidor seja nulo, visto que os estafilococos encontrados no leite cru, leite pasteurizado e coágulo podem ter produzido toxinas termoestáveis que sobreviveram a todo processo de fabricação do queijo Minas frescal. A exemplo disso, em uma amostra de leite pasteurizado do laticínio C foi detectada a presença de enterotoxina, o que será discutido mais adiante. O laticínio A utilizava salmoura a 5°C por 15 min na salga dos queijos, os outros dois realizavam a salga diretamente na massa. Das seis coletas realizadas nesse laticínio, apenas a quinta apresentou contagem. Segundo informações do laticínio, a salmoura era submetida à pasteurização a cada 15 dias. Os laticínios A e C apresentaram também populações de ECP e amostras de coágulo em apenas 1 das coletas realizadas (Tabela 9).

4.2 Caracterização fenotípica de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva

De todas as amostras coletadas que apresentaram qualquer incidência de contaminação por *Staphylococcus* spp. foram isoladas colônias para o teste de coagulase. No total foram isoladas 1.964 colônias de *Staphylococcus* spp. Destas, 304 (15,5%) foram confirmadas como estafilococos coagulase-positiva. A maioria das cepas foram isoladas de leite cru, já que a ocorrência de estafilococos coagulase-positiva foi maior nestas amostras.

Deste total de 304 cepas, foram selecionadas 144 cepas (12 cepas de cada coleta) para a realização das análises genotípicas. A escolha baseou-se primariamente nas diferentes origens de isolamento, a fim de possibilitar a rastreabilidade posterior das cepas pela análise de genotipagem (ERIC-PCR).

4.3 Extração do DNA genômico pelo Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”

As extrações de DNA genômico das culturas foram realizadas com sucesso utilizando-se o Kit comercial. A boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR de sequências de interesse (Figura 1).

Figura 1 - DNA genômico extraído dos isolados de *Staphylococcus*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- cepa C305; 3- cepa C307; 4- cepa C308; 5- cepa C310; 6- cepa C313; 7- cepa C315; 8- cepa C317; 9- cepa C321; 10- cepa C327; 11- cepa C328; 12- cepa C329; 13- cepa C332; 14- cepa C334; 15- cepa C336

4.4 Amplificação de fragmentos do gene *nuc* específico para *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* descritas por Sasaki et al (2010)

As condições descritas por Sasaki e colaboradores (2010) foram testadas sem modificações e os resultados foram obtidos com sucesso. O tamanho dos fragmentos de amplificação esperados era de 359 pb para *S. aureus*, 793 pb para *S. hyicus* e 430 pb para *S. intermedius*. Os fragmentos de interesse nas cepas utilizadas como controle positivo foram amplificados normalmente podendo-se classificar as diferentes espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*) (Figura 2).

Figura 2 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *nuc*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* ATCC 25923; 3- *S. hyicus* ATCC 11249; 4- *S. intermedius* ATCC 29663; 5- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Através de análises moleculares, foi possível identificar entre as 144 cepas isoladas, 101 cepas (70,14%) pertencentes à espécie *S. aureus* e 1 apenas cepa (0,69%) pertencente à espécie *S. hyicus* (Figuras 3-7). A ausência de fragmentos de amplificação em 42 cepas (29,17%) investigadas pode indicar que essas cepas são pertencentes a outras espécies de estafilococos coagulase-positiva (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *nuc*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* ATCC 25923; 3- *S. hyicus* ATCC 11249; 4- *S. intermedius* ATCC 29663; 5- cepa A065; 6- cepa A070; 7- cepa A147; 8- cepa A149; 9- cepa A150; 10- cepa A151; 11- cepa A158; 12- cepa A163; 13- cepa A166; 14- cepa A167; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 4 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *nuc*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* ATCC 25923; 3- *S. hyicus* ATCC 11249; 4- *S. intermedius* ATCC 29663; 5- cepa A350; 6- cepa A351; 7- cepa A352; 8- cepa A353; 9- cepa A354; 10- cepa A355; 11- cepa A357; 12- cepa A358; 13- cepa A359; 14- cepa A360; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

4.5 Tipagem das cepas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva por ERIC-PCR

A amplificação dos isolados apresentou entre 5 e 13 bandas, utilizando-se um marcador de 1kb. No dendograma obtido pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), utilizando o coeficiente de Pearson, verificou-se a presença de 21 grupos (Figuras 5a, b e c). Dentro do grupo 1, observou-se a formação de um subgrupo com *S. aureus* isolados de leite cru (C307, A160, C310, C313), sendo que o isolado C307 obtido do Laticínio C apresenta similaridade genética de 100% com o isolado A160 obtido de Laticínio A. Os isolados C310 e C313 também apresentam similaridade genética de 100% entre si. As cepas referentes a esse subgrupo são oriundas de leite cru, sugerindo uma relação clonal entre os isolados.

Em outro clado, dentro do grupo 1, observa-se que A117, isolado de manipulador; A149 e A150, isolados de leite cru, todos obtidos no Laticínio A, apresentaram similaridade genética de 100%. Isso indica uma provável rota de contaminação do leite cru para o manipulador.

O maior agrupamento (grupo 2) foi formado em sua maioria por isolados do Laticínio A. O isolado A166 (leite cru) e A59 (mesa) apresentaram 100% de similaridade genética, dado sugestivo de deficiência da higiene confirmando a mesma suspeita em relação ao grupo 1. As cepas A65, A77 e A76, provenientes de queijo depois de embalado também apresentaram similaridade genética. As cepas A366 e A61 (manipulador), A68 (queijo antes de embalado), A104 e A147 (leite cru) são similares geneticamente, sendo interessante observar que o queijo apresentou cepa semelhante a isolada de manipuladores, novamente reforçando possíveis falhas de higiene durante o processamento.

As cepas A159, A164 e A168 (leite cru) também apresentaram similaridade genética, bem como A359 e A361 (lira); A387, A388 e A390 (leite cru); C312 e C314 (leite cru). Os isolados C303 e C316 (leite cru), B289 (queijo antes de embalado), A70 (queijo depois de embalado) também foram identificados como geneticamente similares. Por serem laticínios em localidades diferentes, possivelmente trata-se de uma cepa amplamente distribuída na natureza. O grupo 3, assim como os grupos 6 e 9, não apresentaram isolados geneticamente similares.

Dentro do grupo 4, os isolados C327 proveniente de leite pasteurizado e o C334, de mesa no Laticínio C, apresentaram 100% de similaridade.

No grupo 5, os isolados que apresentaram similaridade genética de 100% foram: A376 e A377, provenientes de queijo antes de embalar; B277 e B243 isolados de leite cru. A cepa

B296 encontrada no queijo, B284 (leite cru) e C315 (coágulo) também apresentaram mesmo perfil genético pela técnica do ERIC-PCR.

O grupo 7 foi formado quase que exclusivamente por isolados obtidos do laticínio B, sendo que duas cepas obtidas de Laticínio A, ambas isoladas de tanque, apresentam similaridade de 100% entre si (A357 e A358).

As cepas B186 (leite cru), B194 (pisso) e B260 (queijo antes de embalado), no grupo 8, formaram um clado com 100% de similaridade entre si. Além dessas cepas outras também apresentaram similaridade genética nesse grupo, sendo os isolados A372 (queijo antes de embalado) e B191 (mesa). É interessante observar a presença de cepas geneticamente similares em fases distintas da cadeia de produção do queijo Minas frescal, evidenciando a importância da adoção de práticas adequadas de higiene durante todo o processo.

No grupo 10 observa-se que A378 (embaladeira) e B251 (manipulador) apresentam similaridade de 100%. No grupo 11 as cepas A52 e A157 apresentam similaridade de 100%.

Os isolados A380, A031, A026, A394, B182, B238, B250, não identificados como *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, não agruparam-se com outros isolados.

Figura 5a - Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA com coeficiente de Pearson) dos produtos obtidos na análise de ERIC-PCR dos 145 isolados coagulase positiva obtidos de Laticínios do Estado de São Paulo

Figura 5b - Dendograma formado pelo agrupamento (UPGMA com coeficiente de Pearson) dos produtos obtidos na análise de ERIC-PCR dos 145 isolados coagulase positiva obtidos de Laticínios do Estado de São Paulo

Figura 5c - Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA com coeficiente de Pearson) dos produtos obtidos na análise de ERIC-PCR dos 145 isolados coagulase positiva obtidos de Laticínios do Estado de São Paulo

Poucos estudos têm sido realizados para a identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. através de ERIC-PCR. Mattos (2005) encontrou semelhança maior que 84% em todas as cepas identificadas para *S. aureus*, sendo que as que apresentaram maior similaridade foi de 90% de semelhança. Wieser & Busse (2000) obtiveram padrões com alto grau de similaridade entre cepas isoladas do ar e identificadas como *Staphylococcus epidermidis*, permitindo a clara diferenciação entre as espécies estudadas. Na Bulgária, Jersek et al (1999) compararam cepas de *Listeria monocytogenes* oriundas de humanos e animais com cepas de alimentos, encontrando apenas uma com alto grau de similaridade. Leal (2010) encontrou 81% de similaridade genética entre cepas de *Leishmania braziliensis* e *L. equatorensis*, 72% entre *L. amazonensis* e *L. mexicana*, e 63% entre as citadas anteriormente e *L. chagasi*. Na Holanda, Lipman et al (1996) isolaram 71 cepas de *S. aureus* de vacas com mastite e, dentre elas, 61 apresentavam alta similaridade genética.

O ERIC-PCR foi uma importante ferramenta para avaliar a diversidade genética entre as cepas e sua origem. Além de demonstrar que em alguns casos a cepa encontrada no queijo apresentava similaridade genética com a oriunda do manipulador, leite ou utensílios, pode-se perceber que as cepas apresentam uma similaridade de no mínimo 70%, mesmo coletadas em laticínios de regiões diferentes.

4.6 Amplificação de fragmentos de genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas (SE)

Das 102 cepas selecionadas nos 3 laticínios 86 (84,3%) foram positivas para alguns dos genes de enterotoxinas, sendo para o laticínio A=82,75% (48/58), B=75,57% (22/28) e C=100% (16/16) (tabela 12). Os genes pesquisados foram: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, sendo detectados isoladamente ou em conjunto. O risco de surtos provenientes de queijos desses laticínios é real, pois várias amostras apresentaram contagens acima do mínimo considerado para a produção de toxinas estafilocócicas (log 5 UFC/g), conforme tabelas 9 e 10, e as análises genotípicas confirmaram a capacidade enterotoxigênica de muitas dessas cepas.

Esses dados se assemelham aos encontrados por Keróuanton et al. (2007) na França, que de 33 isolados 29 (87,87%) foram positivos para enterotoxinas e Lawrynowicz-Paciorek et al (2007) na Polônia com 101 cepas e 80 (80%) positivas para SE. Aragon-Alegro et al. (2007) e Bania et al (2006) trabalharam com 50 cepas de ECP e apenas 27 (54%) apresentaram genes produtores de toxinas estafilocócicas.

Tabela 12 - Genes de enterotoxina identificados nos laticínios A, B e C no Estado de São Paulo

LATICÍNIO	Gene identificado para síntese de enterotoxina	Número de Cepas
A	<i>seg + seh</i>	15
	<i>Seg</i>	5
	<i>seh</i>	19
	<i>sea + seh</i>	1
	<i>sec + seg+seh</i>	1
	<i>seg + seh + sei</i>	2
	<i>seg + sei</i>	7
	Negativo	10
B	<i>seg + seh</i>	9
	<i>seg</i>	9
	<i>seh</i>	1
	<i>sea + sec</i>	1
	<i>sea + seg</i>	2
	<i>sea + seg + seh</i>	1
	Negativo	6
C	<i>sec</i>	1
	<i>seg + seh</i>	5
	<i>seg</i>	3
	<i>seh</i>	7

Das 102 cepas testadas, 5 apresentaram amplificação para o fragmento do gene que codifica para enterotoxina SEA, 3 para SEC, 56 para SEG, 59 para SEH e 9 para SEI. Os fragmentos de genes envolvidos na síntese de SEB, SED, SEE e SEJ não foram amplificados em nenhum dos isolados. Em números variados, os genes *seh*, *seg* e *seh + seg* foram os mais comuns aos três laticínios estudados (Tabela 12). Observou-se ainda que 30,40% (31 de 102) das cepas estudadas apresentaram os genes *seg* e *seh*.

Aragon-Alegro et al. (2007) obtiveram 50 isolados provenientes de leite, queijo e sorvete, e dentre eles identificou 27 cepas que amplificaram gene para toxina, sendo 9 toxina *sea*, 2 para *seb*, 10 para *sec*, 4 para *sea + sec*, 2 para *seb + sec*, e nenhum para *sed*.

O laticínio A foi o que apresentou maior diversidade de genes envolvidos (tabela 12), predominando cepas com o gene *seh*, seguido da *seg + seh* e *seg + sei*, que em sua maioria foram isoaldos de leite cru e manipuladores (tabela 13). Essa diversidade genética pode ser explicada pelo fato desse laticínio receber leite de diversos produtores, ampliando as possibilidades de variação genética dos *Staphylococcus* spp.

Tabela 13 - Origem das cepas de *Staphylococcus* com genes identificados de enterotoxinas no laticínio A

ORIGEM	GENE ENTEROTOXINA								
	NEG.	<i>seg</i> + <i>seh</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sea</i> <i>seg</i> + <i>seh</i>	<i>sea</i> + <i>seh</i>	<i>sec</i> + <i>seg</i> + <i>seh</i>	<i>seg</i> + <i>seh</i> + <i>sei</i>	<i>seg</i> + <i>sei</i>
Leite Cru	05	11	3	9	0	0	0	2	5
Leite past.	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lira	2	0	2	1	0	0	0	0	0
Manipulador	1	3	0	3	0	0	0	0	0
Mesa	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Piso	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queijo antes	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Queijo após	0	1	1	2	1	0	1	0	1
Salmoura	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tanque	0	1	0	0	0	0	0	0	0

O laticínio B apresentou diversidade de genes envolvidos na síntese da enterotoxina com predomínio de isolados com o gene *seg* + *seh* e *seg*, com nove cada um deles, mas houve no total seis grupos de genes diferentes identificados nesse laticínio (Tabela 12). A origem das cepas pode ser vista na Tabela 14, e diferentemente do laticínio A a maioria foi isolada de amostras de queijos após a embalagem.

Tabela 14 - Origem das cepas de *Staphylococcus* com genes identificados de enterotoxinas no laticínio B

ORIGEM	GENE ENTEROTOXINA						
	Neg.	<i>seg</i> + <i>seh</i>	<i>seg</i>	<i>Seh</i>	<i>sea</i> + <i>sec</i>	<i>sea</i> + <i>seg</i>	<i>sea</i> + <i>seg</i> + <i>seh</i>
Leite Cru	2	1	1	0	0	0	1
Manipulador	1	1	2	1	0	0	0
Mesa	0	1	1	0	0	0	0
Piso	0	0	1	0	0	0	0
Queijo antes	1	2	2	0	0	0	0
Queijo após	1	1	1	1	1	2	0
Tanque	0	2	0	0	0	0	0

O laticínio C apresentou uma menor variedade de genes encontrados nos isolados, com predomínio do *seh*, totalizando sete cepas (Tabela 12). Essa baixa variabilidade de genes provavelmente se deve ao fato do leite do referido laticínio ser proveniente de um rebanho homogêneo. Nesse laticínio também houve predominância do leite cru como origem da maioria das cepas que amplificaram genes para enterotoxinas (Tabela 15).

Tabela 15 - Origem das cepas de *Staphylococcus* com genes identificados de enterotoxinas no laticínio C

ORIGEM	GENE ENTEROTOXINA				
	Neg	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>seg+seh</i>
Leite cru.	0	0	3	4	4
Leite past.	0	0	0	1	0
Coágulo	0	1	0	0	0
Mesa	0	0	0	1	0
Tanque	0	0	0	0	1

A ocorrência de genes potencialmente produtores de toxinas SEG e SEH tem sido encontrada com frequência por diversos autores. Na República Tcheca, Ruzickova et al. (2007) avaliou 131 cepas isoladas de carne e leite crus e encontrou 16 cepas contendo apenas o gene *seh* e 12 cepas apresentaram o gene *seh* em associação com genes *seg*, *sei*, *sea*, *seb*, *sec* e *sed*. As 131 cepas amplificaram para os seguintes genes, respectivamente: 53% *sei*, 52% *seg*, 23% *sec*, 21% *seh*, 12% *seb*, 5% *sea*, 3% *sed* e 2% *sej*, sendo que a maior associação encontrada foi para *sei* + *seg*, seguido de *sei* + *seg* + *seb*.

Akineden et al. (2001) identificaram 103 cepas de *S. aureus* isoladas de leite proveniente de vacas com mastite, de regiões da Alemanha, sendo que 17 amplificaram para toxina SEI, 21 para associação entre SEG e SEI, 21 para SED e SEJ, 15 para SEC, SEG e SEI, e 1 para SEA e SEC, sendo que nenhuma cepa amplificou para toxinas SEB, SEE e SEH. Em 2008, Akineden e colaboradores isolaram 64 cepas de queijo de cabra e identificaram 1 produtora de *sea*, 18 produtoras de *sec*, e nenhuma para SEB, SED e SEE.

Segundo Argudín et al. (2010), as enterotoxinas SEA, SEC, SEG, SEH possuem atividade emética, enquanto que a SEI apresenta fraca atividade emética e para a SEJ essa atividade não foi identificada. Dessa forma, a maioria dos genes encontrados nas cepas de *S. aureus* dos laticínios possui potencial de causar intoxicação alimentar, apresentando um risco real a saúde do consumidor.

Nos 3 laticínios notou-se a predominância dos genes *seg*, *seh* e associação entre os dois (Tabela 12), sendo que o perfil de cada laticínio individualmente coincide com o geral. Em Portugal, Pereira et al. (2009) verificaram em amostras de queijo, leite cru e de mastite a predominância dos genes *seg+sei*. Fagundes et al. (2010) pesquisaram leite cru em fazendas no Estado de São Paulo e verificaram uma grande variedade genética de *S. aureus* no leite cru, o que pode explicar essa grande variedade encontradas nos laticínios, que recebem diariamente leite de diferentes fazendas.

Em Botucatu, Rall et al. (2008) isolaram 57 cepas de *S. aureus* provenientes de leite cru e pasteurizado, e dentre elas identificaram 39 (68,4%) portadoras de gene SE, sendo a maioria

das toxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*). Dentre as outras toxinas, a maior ocorrência foi de genes de *seg* (11), *sei* (10), *seh* (3) e *sej* (3). Outros autores encontraram também maior ocorrência de genes das toxinas clássicas, com Normano et al (2005; 2006), na Itália, aonde isolaram 298 cepas portadoras em maior número dos genes *sec*, *sea*, *sea* + *sed* e *sed*. Na Hungria, Peles et al. (2007) isolaram 59 cepas de leite, aonde 15 apresentaram genes *sea*, *seb* e *sec* e apenas 1 para gene *seg* + *sei*.

Segundo Bergdoll (1990) a maioria das cepas envolvidas em intoxicações alimentares produz SEA, SEC, SEB, SED e SEE encontradas em ordem decrescente de frequência. Entretanto, a toxina SEH tem sido relacionada em alguns casos de intoxicação estafilocócica (PEREIRA et al, 1996; JORGENSEN et al, 2005).

Na Noruega, Jorgensen et al. (2005) isolaram cepas portadoras do gene *seh* envolvidas em surto de intoxicação estafilocócica causado por ingestão de purê de batata feito com leite cru. Outro caso de surto ocasionado por isolados portadores do gene *seh* ocorreu em Minas Gerais, após uma família ingerir queijo e apresentar sinais de náusea e vômito (PEREIRA et al., 1996).

Os produtos de amplificação para os genes produtores de toxinas estafilocócicas podem ser observados nas Figuras 6 a 14.

Figura 6 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *sea* e *sec*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *sea* ATCC 13565; 3- *S. aureus* produtor de *sec* ATCC 19095; 4- cepa B289; 5- cepa B290; 6- cepa B296; 7- cepa B297; 8- cepa B298; 9- cepa C300; 10- cepa C303; 11- cepa C305; 12- cepa C307; 13- cepa C308; 14- cepa C310; 15- cepa C312; 16- cepa C313; 17- cepa C314; 18- cepa C315; 19- cepa C316; 20- cepa C317; 21- cepa C321; 22- cepa C327; 23- cepa C329; 24- cepa C334; 25- cepa A350; 26- cepa A351; 27- cepa A352; 28- cepa A353; 29- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 7 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *sea* e *sec*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *sea* ATCC 13565; 3- *S. aureus* produtor de *sec* ATCC 19095; 4- cepa A367; 5- cepa A368; 6- cepa A374; 7- cepa A381; 8- cepa A383; 9- cepa A384; 10- cepa A385; 11- cepa A386; 12- cepa A387; 13- cepa A388; 14- cepa A390; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 8 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *seb*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *seb* ATCC 14458; 3- cepa A052; 4- cepa A054; 5- cepa A057; 6- cepa A059; 7- cepa A061; 8- cepa A062; 9- cepa A065; 10- cepa A068; 11- cepa A070; 12- cepa A159; 13- cepa A160; 14- cepa A163; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 9 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *sed*
 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *sed* FRI 361; 3- cepa C310;
 4- cepa C312; 5- cepa C313; 6- cepa C314; 7- cepa C315; 8- cepa C316; 9- cepa C317; 10- cepa
 C321; 11- cepa C327; 12- cepa C329; 13- cepa C334; 14- cepa A350; 15- cepa A351; 16- cepa
 A352; 17- cepa A353; 18- cepa A 354; 19- cepa A355; 20- cepa A356; 21- cepa A359; 22- cepa
 A361; 23- cepa A362; 24- cepa A363; 25- cepa A364; 26- cepa A365; 27- cepa A366; 28- cepa
 A367; 29- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 10 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *see*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *see* ATCC 27664; 3- cepa C305; 4- cepa C307; 5- cepa C308; 6- cepa C310; 7- cepa C312; 8- cepa C313; 9- cepa C314; 10- cepa C315; 11- cepa C316; 12- cepa C317; 13- cepa C321; 14- cepa C327; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 11 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *seg*. 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *seg* FRI 361; 3- cepa B256; 4- cepa B267; 5- cepa B277; 6- cepa B284; 7- cepa B286; 8- cepa B289; 9- cepa B290; 10- cepa B296; 11- cepa B297; 12- cepa B298; 13- cepa C300; 14- cepa C303; 15- cepa C305; 16- cepa C307; 17- cepa C308; 18- cepa C310; 19- cepa C312; 20- cepa C313; 21- cepa C314; 22- cepa C315; 23- cepa C316; 24- cepa C317; 25- cepa C321; 26- cepa C327; 27- cepa C329; 28- cepa C334; 29- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 12 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *seh* 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *seh* FRI 361; 3- cepa A052; 4- cepa A054; 5- cepa A057; 6- cepa A059; 7- cepa A061; 8- cepa A062; 9- cepa A065; 10- cepa A068; 11- cepa A070; 12- cepa A076; 13- cepa A003; 14- Controle negativo (reação de PCR sem DNA); 15- sem reação

Figura 13 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *sei* 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *sei* FRI 361; 3- cepa A367; 4- cepa A368; 5- cepa A374; 6- cepa A381; 7- cepa A383; 8- cepa A384; 9- cepa A385; 10- cepa A386; 11- cepa A387; 12- cepa A388; 13- cepa A389; 14- cepa A390; 15- cepa

Figura 14 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *sej* 1- marcador molecular 100 pb da Promega; 2- *S. aureus* produtor de *sej* FRI 361; 3- cepa C368; 4- cepa C374; 5- cepa C381; 6- cepa C383; 7- cepa C384; 8- cepa C385; 9- cepa C386; 10- cepa C387; 11- cepa C388; 12- cepa C389; 13- cepa C390; 14- cepa C391; 15- Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

4.7 Análises Imunoenzimáticas

As cepas que apresentaram um dos genes codificadores de enterotoxinas clássicas foram submetidas à análise pelo sistema VIDAS®. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Produção de enterotoxina pelas cepas dos laticínios e detecção pelo sistema VIDAS®

Laticínio	Origem	Gene detectado	Produção de enterotoxina
A	Superfície mesa	<i>sea, seh</i>	Positivo
A	Queijo	<i>sec, seg, seh</i>	Positivo
B	Queijo	<i>sea, sec</i>	Positivo
B	Queijo	<i>sea; seh</i>	Positivo
B	Queijo	<i>sea, seg</i>	Positivo
B	Leite cru	<i>sea, seg, seh</i>	Positivo
C	Coágulo	<i>sec</i>	Negativo

Apesar de terem sido isoladas cepas potencialmente produtoras de enterotoxinas em queijos não foi detectada a presença de enterotoxinas nesses queijos. Isso pode ter ocorrido pelo fato de não ter dado tempo de produzi-las até o momento da análise, a quantidade produzida ser abaixo do mínimo detectável pelo aparelho, ou as condições de armazenamento do queijo terem inibido essa produção. Porém, o risco é real, pois o aparelho só detecta enterotoxinas clássicas e genes relacionados a essas enterotoxinas foram a minoria encontrada entre as cepas.

Além das cepas, amostras de leite cru, pasteurizado e queijos foram avaliadas pelo sistema VIDAS® e os resultados estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17 - Presença de enterotoxinas em leite cru, leite pasteurizado e queijos dos 3 laticínios detectadas pelo sistema VIDAS®

Amostra	Amostras analisadas	Amostras Positivas
Leite cru	24	0
Leite pasteurizado	12	1
Queijo antes embalagem	60	0
Queijo embalado	60	0
TOTAL	156	1

Na amostra de leite pasteurizado, do laticínio C, da 1ª coleta, foi detectada presença de enterotoxina. A contagem de ECP nas duas amostras de leite cru nessa mesma coleta foi log 3,3 e log 3,4 UFC/mL e após a pasteurização não houve detecção da bactéria (tabela 5). Como a coleta foi realizada imediatamente após a saída do pasteurizador isso demonstra que embora os estafilococos possam ter sido eliminados pela pasteurização nas amostras analisadas, a

enterotoxina resistiu ao tratamento térmico e pode ter atingido o consumidor, uma vez que os lotes de queijos oriundos desse leite circularam normalmente pelo mercado.

Das 102 cepas identificadas como *S. aureus* e *S. hyicus*, 89 (87,2%) possuíam genes para produção de enterotoxina (Tabela 12). A detecção de enterotoxina em amostra de leite pasteurizado confirma o risco oferecido por uma matéria-prima de baixa qualidade microbiológica. Das cepas analisadas pelo sistema VIDAS®, a maioria secretou enterotoxina, sendo que cerca de metade delas foram isoladas de queijos prontos para o consumo (tabela 16). Esses queijos eram provenientes dos laticínios A e B que tiveram lotes das 2ª, 5ª e 6ª coletas (laticínio A) e 2ª e 4ª coleta (laticínio B) com contagens acima dos padrões de tolerância para ECP, de 3 log UFC/mL, previstos pelo MAPA (BRASIL, 1996), apresentando ainda contagens compatíveis com a produção de enterotoxina (tabelas 9 e 10). Esses dados confirmam o perigo real da presença de enterotoxinas em alimentos, corroborando com os casos de surtos estafilocócicos encontrados na literatura.

Lima (2005) analisou 43 amostras de queijo coalho e 12 extratos de cepas de estafilococos coagulase positiva pelo sistema VIDAS®, das amostras de queijo nenhuma apresentou produção de enterotoxina e em apenas 1 cepa foi detectada a presença de enterotoxina. Borges et al. (2008) analisaram 20 amostras de leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo, oriundos da linha de processamento de queijo coalho e encontraram 4 amostras com presença de enterotoxinas.

Na França, Hennekinne et al. (2007) analisaram 62 amostras de leite e derivados, encontrando enterotoxinas em 20. Vernozzy-Rozand et al. (2004) avaliaram 143 amostras de diversas comidas, entre elas, enlatados, bebidas, carnes, massas e embutidos, e todas apresentaram enterotoxinas. Um surto numa escola na Espanha levou Solano e colaboradores (2013) a avaliarem 13 amostras de vômito, 3 de swab nasal e de unha e 1 amostra do menu servido, encontrando enterotoxinas em 8 amostras de vômito, 1 de swab e 1 no macarrão e tomate servidos.

5 CONCLUSÕES

O leite cru é importante via de entrada de estafilococos coagulase positiva no ambiente de laticínio, muitas contagens estiveram acima do limiar para a produção de enterotoxina.

O processo de pasteurização reduziu a níveis não detectáveis a população de ECP no leite, mas em algumas amostras houve presença de ECP no leite pasteurizado, indicando falhas no processo.

A detecção de enterotoxina no leite pasteurizado, mostra que os riscos permanecem após o processo e que a qualidade da matéria-prima é crucial para a segurança dos laticínios.

No interior dos laticínios, ECP foram detectados nos manipuladores, superfícies e equipamentos antes da sua utilização, indicando falhas nos procedimentos de higienização e fonte de recontaminação.

As contagens de ECP crescem ao longo da produção do queijo e nos laticínios A e B, a grande maioria dos lotes excediam a tolerância para o microorganismo.

Dos 145 isolados identificados por mPCR de ECP, prevaleceu o *S. aureus* (101 isolados) e somente um foi identificado como *S. hycus*, sendo que 43 não foram identificados.

Por meio da análise de ERIC-PCR onde foi possível separar os 145 isolados dos laticínios do Estado de São Paulo em 11 grupos e perceber a similaridade genética entre cepas encontradas no leite cru e no ambiente de laticínio, sendo muitas vezes em amostras de queijos.

A maior parte das cepas isoladas apresentaram genes potencialmente produtores de toxinas estafilocócicas, prevalecendo genes de toxinas G e H em relação aos genes das toxinas clássicas, havendo muitas cepas com mais de um gene presente.

Com o sistema VIDAS® foi possível detectar enterotoxina em uma amostra de leite cru e das 7 cepas isoladas, 5 se revelaram produtoras de enterotoxina, revelando perigo direto ao consumidor.

A ampla maioria das cepas possuíam genes *seg*, *seh*, *sei*, cujas toxinas não são detectáveis por métodos usuais como VIDAS®, o papel dessas enterotoxinas na saúde pública pode ser bastante relevante, mas pouco conhecido.

No caso dos queijos estudados, revela-se a necessidade de métodos que incluam a detecção dessas enterotoxinas nos produtos para uma avaliação clara dos riscos ao consumidor.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 45, p. 139, 1995.
- ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 5, p. 629-632, 1998.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2013.
- _____. **Resolução RDC nº 275**, de 06 de novembro de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/275_02rdc.htm>. Acesso em: 13 set. 2013.
- AKINEDEN,Ö.; HASSAN, A.A.; SCHENEIDER,E.; USLEBER,E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 211-216, 2008.
- AKUTSU, C.K. **Adesão de esporos de Bacillus sporothermodurans ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- ALMEIDA, P.M.P.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e coliformes fecais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.
- ALMEIDA FILHO, E.S., NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.34, p. 578-580, 2000.
- ALVES, A.; HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. **Tipagem genética de microrganismos**. Aveiro: Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Laboratório de Diversidade Microbiana, 2003. 24 p.
- AMARAL, L.A. do; ROMANO, A.P.M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 417-421, 2004.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; KONTA, E.M.; SUZUKI, K.; SILVA, M.G., FERNADES JÚNIOR, A.F.; RALL, R.; RALL, V.L.M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 630–634, 2007.
- ARGUDÍN, M.A.; MENDONZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

ARRUDA, M.L.T. **Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal e padrão de feiras livres de Goiânia-GO e detecção de genes produtores de enterotoxinas A e B por meio da técnica de duplex PCR.** 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Queijos no Brasil.** 2007. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 03 ago. 2013.

BANDEIRA, F.S. **Morfologia e comportamento bioquímico de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* isoladas em vacas leiteiras.** 2001. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

BANIA, J.; DABOWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.E. MOLEND, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 36-41, 2006.

BARRETO, T.L.; STURION, G.L. Perfil epidemiológico dos surtos de toxinfecções alimentares em um município do Estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 24, n. 180/181, p. 78-84, jan./fev. 2010.

BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1264-1270, 2005.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: RIEMMAN, H.; CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne infections and intoxications.** New York: Academic Press, 1990. p. 85-106.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**, Shelbyville, v. 36, p. 610-612, 1973.

BORGES, M.F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência.** 2006. 221 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1421-1438. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977-3978.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n. 451, de 19 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico. Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos.** Brasília. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/451_97.htm>. Acesso em: 18 jun. 2013.

CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; OSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Acta Veterinary Scandinavia**, London, v. 40, p. 315–321, 1999.

CASTRO, V.S.; NASCIMENTO, V.L.V.; OLIVEIRA, D.S.V.; SOARES, M.J.S.; SILVA, M.J.M. Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo Minas frescal comercializado em Teresina-PI. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2007, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Ed. Light House, 2007. p. 1317-1326.

CHAPAVAL, L. **Deteção de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigenicos via PCR.** 2003. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

CORBIA, A.C.G.; NASCIMENTO, M.G.F.; OLIVEIRA, C.Z.F.; NASCIMENTO, E.R. ***Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos.** Seropédica: EMBRAPA, 2000. 14 p. (Documento, 114).

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JUNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 70-74, jan. 2006.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

ESPER, L.M.R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP.** 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 590-592, 1997.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 376-380, 2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, dez. 2003. Suplemento.

FORSYTHE, S J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 182 p.

FREITAS, E.I. **Deteção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal**. 2005. 119p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

FRENEY, J.; KLOOS, W.E.; HAJEK, V.; WEBSTER, A.; BES, A.; BRUN, Y.; VERNIZY-ROZAND, C. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 49, p. 89–502, 1999.

GANDRA, A.E. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 15, p. 158-161, jul./dez. 1995.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, p. 267-282, 1989.

HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 2286–2290, 2005.

HENNEKINNE, J.A.; GUILLIER, F.; PERELLE, S.; De BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S.; KRYSS, S.; LOMBARD, B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 1261-1272, 2007.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Leche y productos lácteos. In: _____. **Ecología microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Acribia, 1985. cap. 18, p. 472-525.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JERSEK, B.; GILOT, P.; GUBINA, M.; KLUN, N.; MEHLE, J.; TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; HERMAN, L. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 103-109, 1999.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; CAUGANT, D.A.; KEARNS, A.; RORVIK, L.M. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* strains from norwegian bulk milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8352–8361, 2005a.

JORGENSEN, H.J.; MATHISEN N.; LOVSETH, A.; KATSUHIKO O.; QVALE K.S.; LONCAREVIC, E. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 252, p. 267–272, 2005b.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, p. 369-375, 2007.

KHAMBATY, F.M.; BENNETT, R.W.; SHAH, D.B. Pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food related outbreak. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 75–81, 1994.

KIBENGE, F.S.B.; ROOD, J.L.; WILCOX, G.E. Bacteriophage typing and other characteristics of *Staphylococcus hyicus* isolated from chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 34, p. 411–415, 1983.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Ann Arbor: American Society for Microbiology, 1999. chap. 16, p. 264-282.

KOMATSU, R.S.; RODRIGUES, M.A.M.; LORENO, W.B.N.; SANTOS, K.A. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos Minas Frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. p. 387–403.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEAL, C.R.B. **Uso da ERIC-PCR para caracterização de amostras de *Leishmania chagasi***. 2010. 77 p. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

LEITE, M.M.; LIMA, M.G.; REIS, R.B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo frescal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 89-93, 2005.

LIMA, A.F. ***Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho***. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LIPMAN, L.J.A.; NIJS, A.; LAM, T.J.G.M; ROST, J.A.; Van DIJK, L.; SCHUKKEN, Y.H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, p. 51-55, 1996.

LIU, P.Y.; LAU, Y.J.; HU, B.S.; SHYR, J.M.; SHI, J.Y.; TSAI, W.S.; LIN, Y.H.; TSENG, C.Y. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 7, p. 1779-1783, 1995.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LOWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W; STEPHENS, C.T.; BRUJIN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2286-2295, 1994.

MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T.; ARAÚJO, F.R.; BONATO, A.L.V.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; SOARES, C.O. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 153-160, 2002.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, p. 39-48, 2003.

MATTOS, E.C. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos, mão de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MATTHEWS, K.R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B.E.; LUTHER, D.A.; OLIVER, S.P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 6, p. 686-688, 1997.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 219-222, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, M.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, 2005.

NOVAK, F.R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 107 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 118, p. 186-193, 2007.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; PEREIRA, J.L.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning, **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 5, p. 559-561, 1996.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 278-282, 2009.

RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES JUNIOR, A.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G.; ARAÚJO JUNIOR, J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 132, p. 408-413, 2008.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas Frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, p. 263-272, 2006.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, p. 171-175, 2006.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SANTILIANO, F.C.; ALEMIDA, B.R.; IGNACCHITI, M.D.C.; PEREIRA JUNIOR, O.S.P. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 1327-1342, 2011.

SANTOS, M.; SILVA, T.V.; GAIOSKI, L.J.; PELOZATO, E.; SANTA, H.S.D. **Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do município de Guarapuava e região**. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste, Salão de Extensão e Cultura, 2008. Disponível em:

<<http://www.unicentro.br/proec/publicacoes/salao2008/artigos/Mariele%20dos%20Santos.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

SASAKI, T.; TERANO, Y.; SHIBATA, T.; KAUAMOTO, H.; KUZUGUCHI, T.; KOYAMA, E. Establishment of highly specific and quantitative immunoassay systems for staphylococcal enterotoxin A, B and C using newly-developed monoclonal antibodies. **Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 49, p. 589-597, 2005.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.

SILVA, L.A.V. **Staphylococcus coagulase positiva em queijo Minas Frescal**. 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, Bom Jesus do Itabapoana, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela Editora, 2010. 12 p.

SINGH, D.V.; MATTE, M.H.; MATTE, G.R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SANYAL, S.S.C.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Molecular analysis of *Vibrio Cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 910-921, 2001.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia dos alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 24 p.

SOLANO, R.; LAFUENTE, S.; SABATE, S.; TORTAJADA, C.; OLALLA, P.G.; HERNANDO, A.V.; CAYLÁ, J. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*: na outbreak at a Barcelona sports club in July 2011. **Food Control**, Guilford, v. 33, p. 114-118, 2013.

SORIANO, J.M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.M.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, p. 60-67, 2002.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.

TEVA, A.; FERNANDEZ, J.C.C.; SILVA, V.L. Imunologia. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro, 2010. cap. 1 p. 92-98.

TCHERNEVA, E.; RIJSENS, N.; NAYDENSKY, C.; HERMAN, L. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of Brucella strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 1/2, p. 169-178, 1996.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 609-615, out. 2002.

WATTS, J.L.; OWENS, E.E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v. 46, p. 1-4, 1989.

WEGENER, H.C.; ANDRESEN, L.O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 57, p. 119-125, 1993.

WILSON, L.A.; SHARP, P.M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, p. 1156-1168, 2006.