

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES TOXIGÊNICOS EM ESTIRPES DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO,
LEITE PASTEURIZADO E QUEIJOS PROVENIENTES DE LATICÍNIOS DO
ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Lidiane Soares Pereira

**SÃO LUÍS – MA
2011**

LIDIANE SOARES PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES TOXIGÊNICOS EM ESTIRPES DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO,
LEITE PASTEURIZADO E QUEIJOS PROVENIENTES DE LATICÍNIOS DO
ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Neide Costa.

**SÃO LUÍS – MA
2011**

Pereira, Lidiane Soares.

Identificação de genes toxigênicos em estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos provenientes de laticínios do Estado do Maranhão, Brasil / Lidiane Soares Pereira.– São Luís, 2011.

78 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

1. *Multiplex* PCR. 2. Toxinas estafilocócicas. 3. Leite. 4. Queijo. I. Título

CDU: 579.67:637.112.3(812.1)

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ___/___/___ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

2º Membro

Orientador

*Aos meus Pais, meu
esposo Márcio e meus
sobrinhos Pietro e Isaac.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e força ao longo desta caminhada, e pela constante iluminação e bênçãos derramadas sobre a minha vida.

Aos meus pais, José e Rosangela, pela dedicação, pelo amor e por sempre estimularem o meu crescimento pessoal.

Ao meu querido e amado esposo Márcio, pela paciência e apoio infindáveis, pela compreensão das minhas ausências, contribuindo para a concretização deste trabalho.

À minha orientadora, Francisca Neide Costa, pela receptividade, pela amizade e por contribuir na minha formação profissional e intelectual através de todos os conhecimentos transmitidos. Aqui fica a minha admiração pelo profissionalismo e responsabilidade com que realiza seu trabalho.

À professora Lúcia Alves pela estimável amizade desde a graduação, sempre disposta a tirar minhas dúvidas, e por também fazer parte do meu crescimento profissional.

À professora Rosangela Zacarias pela receptividade e capacitação em seu laboratório, contribuindo para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga Joyce Bitencourt pela importantíssima contribuição na primeira etapa desta pesquisa, mas principalmente pela amizade e pelas inesquecíveis palavras: “Tudo vai dar certo”. Amo você amiga!

À amiga Lucélia, companheira desta jornada, pela amizade e companheirismo constantes.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia, Elka, Débora, Gabriel, Nancy e Ruth, fica meu carinho por toda a ajuda e companheirismo, e em especial à amiga Ilderlane, pela amizade e pelas constantes mensagens de incentivo.

À minha turma de mestrado: Ylisieux, Júlia, Liane, Ildeci, Aline, Fernando, Takashi, Érico e Herlon por todos os momentos juntos, especialmente às amigas Andréa Pereira e Joicy Cortez pelo apoio, pelas dicas, pela ajuda e pelas palavras positivas no momento mais difícil da pesquisa.

À todos os membros da banca examinadora, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Ao Mestrado em Ciência Animal, pela oportunidade concedida.

PEREIRA, L. S.; COSTA, F. N. **Identificação de genes toxigênicos em estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos provenientes de laticínios do Estado do Maranhão, Brasil.** [Identification of toxigenic genes in strains of *Staphylococcus aureus* isolated of refrigerated raw milk, pasteurized milk and cheeses from the dairy state of Maranhão, Brazil.] 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos patogênicos de grande influência na qualidade do leite e seus derivados, sendo uma das espécies bacterianas mais envolvidas nos casos de intoxicação alimentar e infecções devido à produção de várias toxinas responsáveis por doenças em animais e humanos. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença dos genes toxigênicos, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* por *multiplex* PCR e *tst* por *uniplex* PCR, em estirpes de *S. aureus* com caracterização fenotípica e genotípica isoladas de amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos (coalho e mussarela) provenientes de quatro laticínios do Estado do Maranhão. Foram colhidas 120 amostras, sendo 10 de leite cru refrigerado, 10 de leite pasteurizado e 10 de queijo de cada um dos laticínios, obtidos de cinco lotes diferentes. A contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo estava presente em todas as amostras de leite cru refrigerado, apresentando elevadas contagens de até $>10^6$ UFC/mL. Independente do tipo de inspeção, 100% das amostras de queijo (coalho e mussarela) estavam fora dos padrões vigentes. Foram isoladas 60 cepas de *S. aureus* com identificação fenotípica, das quais 46 amplificaram o gene *femA*, específico desta espécie. Destas 46 cepas, 31 isoladas das amostras de leite cru refrigerado e três do queijo mussarela amplificaram algum gene de toxina. Observou-se 13 grupos genotípicos distintos para a presença dos genes toxigênicos, onde o genótipo mais frequente foi *tst*, presente em 10 (29,4%) cepas de *S. aureus*, seguido por *sed* e *seb+sec+sed*, cada um em quatro (11,8%), *sec* em três (8,8%), *seb*, *see*, *seb+sec* e *sea+seb+sec+tst*, cada um em duas (5,8%), *seb+sed*, *sea+seb+sec*, *sea+sec+tst*, *seb+sec+tst* e *sea+seb+sec+sed+see*, cada um presente em uma (3%) cepa. A presença de apenas um gene foi observada em 21 (61,8%) cepas de *S. aureus*, três (8,8%) amplificaram para dois genes, sete (20,6%) amplificaram três, dois (5,8%) amplificaram para quatro e uma (3%) para cinco genes. O gene *sec* foi o mais frequente em 15 (44,1%) cepas, seguido por *seb* e *tst* cada um presente em 14 (41,1%), *sed* em 10 (29,4%), *sea* em cinco (14,7%), e por último *see* que estava presente em três (8,8%) cepas de *S. aureus*. A análise molecular para identificação da espécie *S. aureus* apresentou melhor especificidade em relação aos testes fenotípicos. Os isolados demonstraram potencial genético para a produção de uma ou mais toxinas com a presença simultânea de dois a cinco genes, e a *multiplex* PCR se mostrou eficaz e exequível para investigação de cinco diferentes genes de toxinas.

Palavras-chave: *multiplex* PCR, toxinas estafilocócicas, leite, queijo.

PEREIRA, L. S.; COSTA, F. N. **Identification of toxigenic genes in strains of *Staphylococcus aureus* isolated of refrigerated raw milk, pasteurized milk and cheeses from the dairy state of Maranhão, Brazil.** [Identificação de genes toxigênicos em estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos provenientes de laticínios do Estado do Maranhão, Brasil.] 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the pathogens of great influence on the quality of milk and dairy products, being one of the bacterial species most involved in cases of food poisoning and infections by producing toxins responsible for several diseases in animals and humans. The objective of this study was to investigate the presence of toxigenic genes, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* by *multiplex* PCR and *tst* by *Uniplex* PCR in strains of *S. aureus* with phenotypic and genotypic characterization isolated from samples of refrigerated raw milk, pasteurized milk and cheeses (rennet and mozzarella) from four dairies in the state of Maranhão. We collected 120 samples, 10 of refrigerated raw milk, 10 of pasteurized milk and 10 of cheese of each of dairies obtained from five different lots. The contamination by *Staphylococcus* coagulase positive was present in all samples of raw milk refrigerated with high counts to $>10^6$ UFC/mL. Regardless of the type of inspection, 100% of the samples of cheese (rennet and mozzarella) were outside the current standards. Were isolated 60 strains of *S. aureus* with phenotypic identification, of which 46 amplified the gene *femA*, specific to this species. Of these 46 strain, 31 isolated of samples from refrigerated raw milk and three of mozzarella cheese amplified a gene of toxins. Were observed 13 distinct genotypic groups for the presence of toxigenic genes, where the most frequent genotype was *tst* in 10 (29.4%) strains of *S. aureus*, followed by *sed* and *seb+sec+sed* each in four (11.8 %), *sec* in three (8.8%), *seb*, *see*, *seb+sec* and *sea+seb+sec+tst* each in two (5.8%), *seb+sed*, *sea+seb+sec*, *sea+sec+tst*, *seb+sec+tst* e *sea+seb+sec+sed+see* each present in one (3%) strain. The presence of only one gene was observed in 21 (61.8%) strains of *S. aureus*, three (8.8%) amplified for two genes, seven (20.6%) amplified for three, two (5.8%) amplified for four and one (3%) for five genes. The gene *sec* was more frequent in 15 (44.1%) strains, followed by *seb* and *tst* present in 14 (41.1%) each, *sed* in 10 (29.4%), *sea* in five (14, 7%), and *see* present in three (8.8%) strains of *S. aureus*. Molecular analysis to identify the species *S. aureus* showed better specificity in relation to phenotypic testing. The isolates showed genetic potential to produce one or more toxins to the simultaneous presence of two to five toxigenic genes, and *multiplex* PCR was effective and feasible for investigation of five different genes of toxins.

Keywords: *multiplex* PCR, staphylococcal toxins, milk, cheese

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Qualidade do leite e queijos.....	19
3.2 <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2.1 Fatores de virulência produzidos por <i>Staphylococcus</i>	25
3.2.2 Toxinas estafilocócicas e seus fatores genéticos.....	28
3.2.3 Intoxicação alimentar estafilocócica.....	30
3.2.4 Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> e suas toxinas.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Local e Colheita das amostras.....	37
4.2. Pesquisa do Gênero <i>Staphylococcus</i>	38
4.3. Identificação Fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
4.3.1 Teste de catalase.....	40
4.3.2 Teste de coagulase livre em tubo.....	40
4.3.3 Teste de DNase.....	40
4.3.4 Prova de voges-proskauer.....	41
4.3.5 Teste do manitol (aerobiose e anaerobiose), maltose e trealose (aerobiose).....	41
4.4 Extração do DNA Genômico de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
4.5 Confirmação Genotípica das Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.6 Detecção dos Genes Toxigênicos.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÕES.....	61
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Sequência dos nucleotídeos e tamanho dos produtos da PCR dos genes investigados nos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
2. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e percentual de <i>Staphylococcus aureus</i> com identificação fenotípica em amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos, 2011.....	48
3. Número de cepas de <i>S. aureus</i> com caracterização fenotípica e genotípica (<i>femA</i>) em amostras de leite cru refrigerado e queijos, 2011.....	52
4. Distribuição das 46 cepas <i>S. aureus</i> , isolados de amostras de leite cru refrigerado e queijos, com caracterização genotípica (<i>femA</i>) quanto à amplificação ou não de genes toxigênicos, 2011.....	54
5. Perfil genotípico das 34 cepas de <i>S. aureus</i> isolados do leite cru refrigerado e queijo mussarela quanto à presença dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> e <i>tst</i> , 2011.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	38
2. Identificação Fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
3. Produtos de amplificação dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> nas cepas referência de <i>S. aureus</i> através de PCR uniplex.....	51
4. Produtos de amplificação dos genes <i>femA</i> e <i>tst</i> nas cepas referência de <i>S. aureus</i> através de PCR uniplex.....	51
5. Produtos de amplificação simultânea dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> das cepas referência de <i>S. aureus</i> através de multiplex PCR.....	54
6. Frequência dos genes das SEs clássicas (<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>se</i> , <i>see</i>) e da TSST-1 (<i>tst</i>) nos 34 isolados de <i>S. aureus</i> portadores de genes toxigênicos, 2011.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ETs	<i>Exfoliative Toxins</i>
ETA	<i>Exfoliative Toxin A</i>
ETB	<i>Exfoliative Toxin B</i>
<i>femA</i>	<i>Factors Essential for Methicillin Resistance</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
INCSSN	<i>International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature</i>
g	Gramas
HCL	Ácido Clorídrico
KDa	KiloDalton
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente

pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	Picomol
PTSAgs	<i>Pyrogenic Toxin Superantigens</i>
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo Iniciador
SEs	<i>Staphylococcal Enterotoxins</i>
SEA	<i>Staphylococcal Enterotoxin A</i>
SEB	<i>Staphylococcal Enterotoxin B</i>
SEC	<i>Staphylococcal Enterotoxin C</i>
SED	<i>Staphylococcal Enterotoxin D</i>
SEE	<i>Staphylococcal Enterotoxin E</i>
SEG	<i>Staphylococcal Enterotoxin G</i>
SEH	<i>Staphylococcal Enterotoxin H</i>
SEI	<i>Staphylococcal Enterotoxin I</i>
SEJ	<i>Staphylococcal Enterotoxin J</i>
SEL	<i>Staphylococcal Enterotoxin L</i>
SEI	<i>Staphylococcal enterotoxin-like</i>
SEM	<i>Staphylococcal Enterotoxin M</i>
SEM	<i>Staphylococcal Enterotoxin N</i>
SEO	<i>Staphylococcal Enterotoxin O</i>
SEP	<i>Staphylococcal Enterotoxin P</i>
SEQ	<i>Staphylococcal Enterotoxin Q</i>
SER	<i>Staphylococcal Enterotoxin R</i>
SEU	<i>Staphylococcal Enterotoxin U</i>
<i>sea / ent</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica
<i>sea</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica A
<i>seb</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica B
<i>sec</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica C
<i>sed</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica D

<i>see</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica E
<i>seg</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica G
<i>seh</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica H
<i>sei</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica I
<i>sej</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica J
<i>sel</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica L
<i>sem</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica M
<i>sen</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica N
<i>seo</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica O
<i>sep</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica P
<i>seq</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica Q
<i>ser</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócica R
<i>seu</i>	Gene para enterotoxina estafilocócica U
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIRVETA	Sistema de Informação para a Vigilância das Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe
SSSS	<i>Staphylococcal Scalded Skin Syndrome</i>
Tris-HCl	Aminometano-ácido clorídrico
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin 1</i>
<i>tst</i>	Gene da toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
μM	Micromolar
μL	Microlitro

1 INTRODUÇÃO

O leite e o queijo são alimentos amplamente consumidos e apreciados em todo o mundo, e destacam-se pelo sabor e a riqueza de seus componentes nutricionais que favorecem o desenvolvimento do organismo. Portanto, a qualidade destes alimentos deve ser garantida, pois a sua rica composição química também favorece a multiplicação de microrganismos patogênicos que causam sérias desordens à saúde.

A mastite é uma das enfermidades que mais influenciam a qualidade do leite, e dentre os microrganismos responsáveis por essa enfermidade, destaca-se o gênero *Staphylococcus* (FONSECA & SANTOS, 2000; DIAS, 2007), sendo a espécie *Staphylococcus aureus* de grande ocorrência em casos subclínicos de mastite, e pode estar presente em cerca de 50% das infecções sem manifestações clínicas da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al., 1999; ZECCONI & HAHN, 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004), o que interfere na qualidade dos derivados produzidos na indústria a partir do leite.

Esta bactéria possui a capacidade de se desenvolver em diferentes condições ambientais, habitando naturalmente a pele e membranas mucosas do ser humano e animais, em especial a região naso-faríngea, e sua presença em alimentos pode originar-se de manipuladores doentes ou sãos, portadores do microrganismo. Os manipuladores de alimentos representam elo indiscutível na cadeia epidemiológica das intoxicações alimentares (TRANTER, 1990), servindo inclusive como indicador higiênico-sanitário na indústria alimentícia visto que representam a principal fonte de veiculação (FERREIRA et al., 2008).

As espécies de *Staphylococcus* podem produzir uma série de toxinas, e entre estas estão as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) clássicas (SEA, SEB, SED, SEE e SEE) que recebem essa denominação porque são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação alimentar com quadros de vômito, diarreia, náuseas e debilidade generalizada. Novas SEs têm sido descritas, e até o momento já foram descobertas mais 13 delas (SEG a SEU), aumentando o número de cepas toxigênicas circulantes. Esta bactéria ainda

pode produzir a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as toxinas esfoliativas (ETs) do tipo A e B (ETA e ETB). A TSST-1 é responsável por desordens multissistêmicas, podendo levar a morte por choque letal se não tratada adequadamente. As ETs são responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada (SSSS) que se apresenta pela formação de grandes bolhas e esfoliação extensa da pele (aparência de pele escaldada) e pelo impetigo bolhoso que se apresenta como lesões bolhosas localizadas com sinais de inflamação (LUZ, 2009; FREITAS et al, 2009).

A intoxicação estafilocócica constitui a causa mais freqüente de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em muitos países e ocorre após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas, destacando-se o leite cru, o leite pasteurizado e os queijos como os produtos lácteos mais incriminados, sendo o *S. aureus* o microrganismo mais freqüente nas investigações epidemiológicas (LE LOIR et al., 2003). Segundo o Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2009), ocorrem anualmente 38,6 milhões de casos de doenças gastrointestinais causadas por patógenos conhecidos e 13,6 milhões (36%) deste total são atribuídas as DTAs.

Dessa forma o *S. aureus* é considerado um microrganismo de grande relevância no aspecto da saúde pública devido à produção de várias toxinas causadoras de intoxicações alimentares, altamente resistentes a elevadas temperaturas, tendo ainda a capacidade de produção simultânea de diferentes tipos de toxinas, o que aumenta significativamente os seus efeitos toxigênicos (JAY, 1994; ZECCONI & HAHN, 2000; DINGES et al., 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Para avaliar o papel das toxinas estafilocócicas é necessária a utilização de testes imunológicos para a detecção das mesmas em alimentos, cuja sensibilidade e especificidade destes métodos sempre dependem da obtenção de quantidades detectáveis de toxinas e podem variar significativamente com a pureza dos reagentes (FREITAS et al., 2004; BORGES et al., 2008b).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma alternativa muito específica, sensível, relativamente rápida e

barata aos tradicionais ensaios imunológicos que dependem de expressão gênica para a confiabilidade e sensibilidade adequada (JOHNSON et al., 1991). Esta técnica permite identificar *S. aureus* e seus genes de toxinas, através da análise baseada nas sequências de nucleotídeos do microrganismo, com amplificação do segmento específico do gene investigado.

Entre as técnicas de PCR, a *multiplex* PCR consiste na amplificação simultânea de vários genes, através da utilização de múltiplos pares de iniciadores na mesma reação. É amplamente aplicado em várias áreas da microbiologia para identificação rápida de espécies microbianas (SETTANNI & CORSETTI, 2007), apresentando potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (KONEMAN et al., 2001).

O setor de laticínios tem contribuído fortemente para a economia do País, e segundo dados da pesquisa trimestral do leite do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), somente no 1º trimestre de 2011 os estabelecimentos industriais inspecionados adquiriram 5.484 bilhões de litros de leite, dos quais 5.466 bilhões de litros foram industrializados. No ano de 2009, o Estado do Maranhão produziu cerca de 355 milhões de litros de leite (IBGE, 2009), ocupando o 4º lugar na produção leiteira da Região Nordeste com uma taxa de crescimento de 156% entre os anos de 1999 e 2008 (SEBRAE, 2010).

O Estado possui 12 laticínios sob inspeção estadual e 13 sob inspeção federal com beneficiamento de leite e diversos derivados, com produção crescente a cada ano. No ano de 2009 foi anunciado um investimento de cerca de 4 milhões de reais para o setor de laticínios no Maranhão (MILKNET, 2009), de forma a aumentar a produção. Dessa forma, é primordial a elaboração de produtos com qualidade, o que depende diretamente da matéria-prima e da manipulação e processamento adequados na indústria, garantindo assim, maior competitividade no mercado com produtos lácteos de outros Estados.

Diante da ausência de estudos sobre a presença de genes codificadores de toxinas em estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal produzidos no Estado do Maranhão, e da

importância que o setor de laticínios vem exercendo sobre a economia maranhense, a pesquisa em leite e queijos provenientes de laticínios deste Estado, configura-se no início para o conhecimento do perfil genotípico das cepas toxigênicas circulantes, além de gerar informações sobre os reais riscos das doenças que podem ser causadas por este microrganismo, que é um dos principais agentes envolvidos nas DTAs e infecções que atingem milhões de pessoas no mundo, todos os anos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar genes toxigênicos em estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos provenientes de laticínios do Estado do Maranhão.

2.2 Específicos

- Isolar e quantificar colônias de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos (coalho e mussarela);
- Realizar testes bioquímicos para a identificação fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados das amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos (coalho e mussarela);
- Amplificar o gene *femA* para a identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*;
- Identificar os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, que codificam as enterotoxinas estafilocócicas clássicas, através de *multiplex* PCR;
- Identificar o gene *tst*, que codifica a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico, através de *uniplex* PCR.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Qualidade do Leite e Queijos

O leite e seus derivados são ricos em proteínas, vitaminas e minerais como o cálcio, que favorecem o crescimento e a manutenção de uma vida saudável (CARVALHO et al., 2002). O Leite possui um papel fundamental na nutrição do ser humano, particularmente nos primeiros meses de vida, visto que fornece todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do organismo, portanto, é de grande importância que seja garantida a integridade e a qualidade intrínseca deste alimento e de seus derivados, destinados ao consumo humano (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Devido a sua constituição, o leite torna-se um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos podendo ser responsável pela veiculação de importantes zoonoses ao ser humano. Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e conseqüentemente os derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (LUZ, 2009).

A qualidade do leite está diretamente relacionada com a qualidade higiênica da ordenha, e esta se inicia com a sanidade do rebanho, visto que muitas enfermidades do gado leiteiro afetam a composição original, o sabor, o cheiro, a viscosidade e a qualidade microbiológica do leite (SOMMERHÄUSER et al., 2003; DINGWELL et al., 2004). Dentre as várias enfermidades que influenciam na qualidade do leite e de seus derivados, a mastite é considerada a mais freqüente e onerosa para a produção leiteira mundial (MONSALLIER, 1986; ANDRADE et al., 2000).

No Brasil, as perdas econômicas estimadas, em propriedades leiteiras com produção média de 18 litros/dia, variam de US\$ 1.204,66 a US\$ 134.904,00 por ano (COSTA et al., 1999). Os prejuízos devem-se principalmente pela diminuição da produção de leite de até 50%, redução da

qualidade nutritiva, aumentos dos custos com tratamento e descarte de vacas (RADOSTITS et al., 2002).

Dentre os derivados do leite, o queijo é um dos mais consumidos, apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor (FREITAS et al., 2009). O queijo é definido como um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactéria específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O setor de laticínios tem grande relevância para a economia do país porque contribui com cerca de 10% do valor global da indústria brasileira de alimentos (FREITAS et al., 2009). O Brasil tem registrado anualmente recorde de exportações. Somente em 2009, o volume de leite embarcado sofreu uma queda de 54,78% devido a crise econômica mundial. Em 2008, o País vendeu internacionalmente 142,4 milhões de quilos de produtos lácteos, somando um faturamento de US\$ 509,1 milhões (PONTES, 2010).

Dentre os produtos lácteos mais tradicionais do nordeste brasileiro destaca-se o queijo coalho, cuja fabricação representa importante atividade sócio-econômica, sendo bastante consumido pela população das mais diversas faixas de renda. É produzido por indústrias sob inspeção, porém a maior produção ainda é de origem artesanal, o que pode oferecer consideráveis riscos à saúde pública, devido às condições inadequadas de deste tipo de processamento, principalmente pela não pasteurização do leite (NASSU et al., 2001). Outro destaque é o queijo mussarela, um dos mais fabricados no Brasil e com índices crescentes de consumo, sendo o queijo de massa filada mais consumido no mundo (SPADOTI & OLIVEIRA, 1999).

O queijo é um dos alimentos mais difundidos no mundo e o que recebeu maiores modificações nas técnicas de elaboração, e em consequência disso, tem-se hoje, centenas de tipos desse produto. É considerado excelente

fonte de cálcio, fósforo e proteínas e possui período de conservação muito superior ao do leite e, por ser um produto que possui ampla variedade, oferece ao consumidor possibilidade de escolher, dentre muitos, aquele que melhor lhe convier (PEREIRA, 2006).

No entanto, o queijo também é considerado um veículo freqüente de patógenos que o tornam impróprio para o consumo (BUYSER et al., 2001) e a contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças veiculadas por alimentos (FEITOSA, 2003).

Entre os microrganismos que podem contaminar o leite e o queijo, o *Staphylococcus* spp. tem sido considerado um dos mais freqüentemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar e considerada uma das mais importantes bactérias causadoras de doenças de origem alimentar (VERAS et al., 2003), juntamente com *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (BUYSER et al., 2001).

A pasteurização do leite, tanto para consumo *in natura* como para a produção de queijos, reduz os riscos de toxinfecções alimentares, entretanto, falhas durante o processamento e comercialização do queijo podem favorecer a incorporação de matérias estranhas de origem biológica ou não. A contaminação microbiana de queijos é preocupante ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *S. aureus* e *Salmonella* são comumente encontradas em derivados lácteos (PERESI et al., 2001).

Elevados índices de *S. aureus* ocorrem no leite e derivados, tanto no Brasil como em outros países do mundo, incluindo cepas de estafilococos produtoras de diversas toxinas. O queijo ocupa lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, veiculando principalmente *Staphylococcus* spp (FREITAS et al., 2009), principalmente pelo fato deste microrganismo ser o principal agente etiológico da mastite bovina (ZCHÖCK et al., 2000), e por estar naturalmente presente na pele e membranas mucosas do homem (YANG et al, 2007).

Rapini et al. (2005) ao analisarem amostras de swab da palma das mãos, fossas nasais e orofaringe de manipuladores de queijo de cabra em Belo

Horizonte-MG, isolou 45 cepas de *Staphylococcus* de várias espécies. Uma vez que o ser humano pode carrear cepas de *Staphylococcus* enterotoxigênicos de maneira transitória ou residente em diversos sítios (superfície da pele, fossas nasais, orofaringe, feridas supurativas, etc), tornam-se significativas as chances de veiculação delas para os alimentos.

Na cidade de Fortaleza-CE, Borges et al. (2008b) analisaram 100 amostras de produtos de um laticínio (leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo), onde *S. aureus* estava presente em 67% das amostras de leite cru e em 18,8% das amostras de queijo.

Em um estudo realizado no Estado de São Paulo, foram coletadas 54 amostras de leite cru refrigerado de cinco (05) diferentes fazendas leiteiras, das quais 38 estavam contaminadas por *S. aureus* com concentrações de até $8,9 \times 10^5$ UFC/g. Embora a lei brasileira não estabeleça limites para a quantidade de *S. aureus* no leite cru e pasteurizado, sabe-se que a quantidade de enterotoxinas produzidas por cepas enterotoxigênicas atinge níveis suficientes para provocar sintomas de doenças de origem alimentar, quando *S. aureus* excede concentração superior a 10^5 UFC/mL (RALL et al., 2008).

Na República Checa, Rzichová et al. (2008) ao analisarem 879 amostras de diversos tipos de alimento e leite, verificou que *S. aureus* estava presente em 220 amostras, onde 131 cepas eram enterotoxigênicas. Na Itália, Morandi et al. (2007) isolou um total de 112 cepas de *S. aureus* em diversos produtos lácteos com capacidade de produção de enterotoxinas .

A maioria dos surtos epidêmicos provocados por leite e queijos contaminados por *S. aureus* apresenta população maior ou igual a 10^5 UFC/g de alimento, apesar de na literatura, serem encontrados dados sobre a presença de enterotoxina em alimentos contendo até 10^3 UFC/g de *S. aureus*. De acordo com a RDC nº 12, do Ministério da Saúde (Brasil, 2001), o limite para estafilococos produtores de coagulase em queijos de médio teor de umidade é 10^3 UFC/g e de 5×10^2 UFC/g para queijos de alta umidade. Apesar da existência de padrões oficiais, a qualidade do queijo produzido em pequenos laticínios é, muitas vezes incerta (PEREIRA, 2006).

Em todo o mundo, a qualidade do leite destinado ao consumo humano vem preocupando os pesquisadores e autoridades, devido sua importância nutricional, econômico-social e de saúde pública, pois a utilização do leite de má qualidade microbiológica pela indústria pode acarretar em perdas econômicas e riscos à saúde do consumidor. Para reduzir os riscos da presença de microrganismos indesejáveis no leite cru, é necessário implementar medidas para diminuir a prevalência das infecções intramamárias, competindo aos setores de captação de leite das usinas e aos serviços de extensão, incrementarem o desenvolvimento das atividades de orientação e apoio aos produtores, com a finalidade de aprimorar as técnicas de produção e obtenção do produto (CUNHA & CUNHA, 2007).

3.2 *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, descritas pela primeira vez em 1879, são cocos Gram positivos com cerca de 1µm de diâmetro, encontrados aos pares como pequenas cadeias ou em cachos similares aos de uvas (FORSYTHE, 2002; GERMANO & GERMANO, 2003). Possuem uma única parede celular de peptidoglicano, caracterizada por múltiplos resíduos de glicina com pontes de peptídeos, o que torna a bactéria sensível a lisostafina (CROSSLEY, 1997), característica esta que permite a sua diferenciação do gênero *Micrococcus* (TRABULSI et al., 2002).

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986), a família Micrococcaceae é composta por quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*, sendo o gênero *Staphylococcus* atualmente dividido em cerca de 42 espécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006).

As bactérias pertencentes a este gênero são catalase e termonuclease positivas, coagulase positivos ou negativos dependendo da espécie (KLOSS & LAMBE, 1991). Somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são

coagulase positivo. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativo (BAIRD-PARKER, 1990).

São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 4°C a 46°C, sendo a temperatura ótima de 35°C a 37°C e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio. Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO & LANDGRAFF, 2000).

Apresentam algumas características bioquímicas importantes e que são utilizadas para a identificação das espécies. São desoxirribonuclease (DNAse) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis, e dependendo da espécie, fermentam açúcares como manitol (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI, 2002), maltose e trealose (MAC FADDIN, 1976; APHA, 2001). Produzem várias enzimas extracelulares, como a lipase, nuclease, catalase e coagulase, além das toxinas estafilocócicas (MADANI, 1998). O método clássico para contagem e diferenciação dos estafilococos é pelo uso de Ágar Baird-Parker. Seus agentes inibitórios, telurito, glicina e cloreto de lítio são eficientes para selecionar *S. aureus*, e a gema de ovo adicionada ao meio permitem a regeneração das células injuriadas, além de facilitar a diferenciação por meio da hidrólise da lipovitelina presente (SILVA et al., 1997).

O *Staphylococcus* spp. possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA et al., 2001). Como são comumente encontrados nas fossas nasais, garganta, intestino, pele humana e em mucosas, tais como bucal, nasal e auricular, as infecções estafilocócicas podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou portadores sadios por contato direto ou indireto, ocasionando foliculite, furunculose, carbunculose e impetigo, quando na pele (BERNARDO et al., 2005).

No gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* sempre foi a espécie mais importante relacionada com uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos

sinais clínicos e gravidade das infecções causadas por *S. aureus* (BANNERMAN, 2003).

Este patógeno representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, conseqüentemente, a mais extensivamente estudada. O *S. aureus* é responsável por uma imensa quantidade de problemas médicos, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteremias adquiridas em hospitais. Um grande número de infecções já foi relatado por conta do desenvolvimento de procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (CASEY et al., 2007).

A capacidade de crescer em diferentes condições ambientais faz com que o *S. aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos e sua presença pode provir dos próprios manipuladores portadores de infecções piogênicas ou de portadores sãos que alojam estas bactérias no nariz, na garganta ou na superfície das mãos. Assim o portador de estafilococos enterotoxigênicos, como manipulador de alimentos representa elo indiscutível na cadeia epidemiológica da toxínose alimentar (TRANTER, 1990).

No que diz respeito aos animais, estes podem desenvolver infecções estafilocócicas e muitos carregam o microrganismo na narina e outros sítios anatômicos. Entretanto, a mais expressiva possibilidade de produção de enterotoxinas em alimentos por estafilococos transferidos da fonte animal está vinculada a animais com mastite (AKINEDEN et al., 2001).

3.2.1 Fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* têm sido responsáveis por diversas infecções: endocardite, osteomelite, entre outras, além de intoxicação de origem alimentar (MATTOS, 2005). *S. aureus* pode produzir diversas toxinas, que são comumente substâncias de origem protéica, produzidas por alguns microrganismos e que contribuem para sua patogenicidade (KONEMAN et al., 2001).

Muitos fatores de virulência contribuem para o potencial patogênico de *S. aureus*. Estes fatores incluem as hemolisinas α , β , γ , δ , que são enzimas que lisam as hemácias, além da leucocidina (BANNERMAN, 2003). Os fatores secretados incluem várias enzimas, citotoxinas, exotoxinas, e toxinas esfoliativas, cuja principal função é transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes que as bactérias possam utilizar para seu crescimento. Entre estes fatores secretados destacam-se as exotoxinas que incluem as SEs e a TSST-1, que subvertem o sistema imune interferindo nas principais repostas imunológicas do hospedeiro (PINCHUK et al., 2010).

Algumas linhagens podem vir a formar uma cápsula de natureza polissacarídica, contribuindo para impedir a fagocitose do microrganismo por células de defesa. Podem produzir e excretar a proteína A, a qual tem alta afinidade pela região Fc das moléculas de IgG, dificultando a ação do sistema imunológico. Produzem, além disso, uma série de enzimas, como a catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, e a coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência a opsonização e fagocitose (KONEMAN et al., 2001).

A coagulase produzida por *S. aureus*, é um fator enzimático que causa coagulação da fibrina, resultando numa espécie de coágulo. A produção da coagulase é um importante determinante fenotípico na caracterização de isolados de *S. aureus* (KIM et al., 2001). Geralmente está associada a patogenicidade, apesar do seu papel como fator de virulência ainda não estar esclarecido. Sabe-se que o coágulo produzido por esta enzima resulta no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro (SILVA et al., 2005; PRATTEN et al., 2001).

Vários desses mecanismos específicos de virulência são ativados após a ligação da bactéria à superfície da célula hospedeira, favorecida por adesinas. A adesão, processo que envolve várias etapas, está relacionada com a presença de estruturas e moléculas específicas na superfície bacteriana que promovem uma ligação irreversível na célula hospedeira. Cápsula, pili, proteínas ligadas a fibronectina e proteína A estão incluídos entre esses

fatores, cuja função primária encontra-se associada ao processo de adesão. A expressão dessas e de outras adesinas é intimamente influenciada por estímulos externos (VAN BELKUM, et al., 2002).

Nos últimos 100 anos, o *S. aureus* tem causado ciclos de surtos na comunidade hospitalar, desenvolvendo resistência a todos os antibióticos utilizados no combate deste patógeno, mas os mecanismos exatos que levam a epidemias de doenças virulentas não são totalmente compreendidos. Este microrganismo é um patógeno versátil, capaz de provocar uma ampla gama de doenças humanas, devido a uma combinação de virulência, invasão e resistência a antibióticos. O espectro de infecções estafilocócicas variam de espinhas e furúnculos, a síndrome do choque tóxico e sepse, a maioria dos quais dependem de numerosos fatores de virulência. Por outro lado, algumas infecções, como intoxicação alimentar, dependem de um único tipo de fator de virulência: as SEs (ORTEGA et al., 2010).

A produção de enterotoxinas não está restrita a espécie de *S. aureus*, outras espécies também são capazes de produzi-las, característica relatada para outras espécies coagulase positivo. Além destas, estudos laboratoriais evidenciaram espécies coagulase negativas, capazes de produzir toxinas, como *S. xylois*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus* (PEREIRA, et al., 2001). Acreditava-se que a produção de enterotoxinas estivesse ligada às cepas produtoras de coagulase e termonuclease (TNase), entretanto muitas espécies de *Staphylococcus* demonstraram produzir enterotoxinas mesmo na ausência de coagulase e termonuclease. Pelo menos dez das espécies coagulase negativas, produzem enterotoxinas (JAY, 2000).

3.2.2 Toxinas estafilocócicas e seus fatores genéticos

O *S. aureus* produz uma grande variedade de exoproteínas que contribuem para a sua capacidade de colonizar e causar doença em mamíferos. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, que incluem as SEs, a TSST-1 e as ETs. Cada uma dessas toxinas é conhecida por seus poderosos efeitos sobre as células do sistema imunológico, mas muitas delas também têm outros efeitos biológicos (DINGES et al., 2000).

Diferentes tipos de SEs já foram descobertas, sendo descritas inicialmente as enterotoxinas clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, de maior ocorrência e comumente envolvidas em quadros de intoxicação estafilocócica envolvendo alimentos, com percentual de 95% dos casos (CREMONESI et al., 2005). Na sequência, novas enterotoxinas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) e seus genes correspondentes (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu*) foram descritos, embora seu envolvimento com os surtos de intoxicação alimentar não estejam ainda bem esclarecidos (FREITAS et al., 2004; BORGES et al., 2008a; ANDRADE, 2008, SANTANA et al., 2010a).

O *International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature (INCSSN)* recomendou que apenas os superantígenos estafilocócicos que induzem vômito após administração oral experimental em macacos pode ser designado como SE. Aqueles que não promovem êmese no modelo experimental designado ou não foram testados devem receber a denominação de *staphylococcal enterotoxin-like (SEI)*. Desta forma as enterotoxinas dos tipos SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ e SEU deveriam ser renomeadas para SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ e SEIU, respectivamente (OMOE et al., 2005).

Duas das características mais importantes das SEs são a resistência à inativação por proteases gastrointestinais, bem como pela ação da pepsina, característica que explica a capacidade de permanecerem ativas após sua ingestão e a manutenção de sua atividade em certos alimentos; e sua termoestabilidade, extremamente importante em termos de segurança

alimentar, uma vez que elas permanecem ativas no alimento mesmo após seu processamento térmico. Essa termoestabilidade depende do meio onde esteja inserida e pode ser influenciada pela variação do pH, concentração salina e outros fatores ambientais relacionados ao nível de desnaturação da toxina (SORIANO et al., 2002).

Além da intoxicação estafilocócica, outra doença causada por *Staphylococcus* é a TSS, uma doença sistêmica grave associada com a intoxicação aguda com TSST-1 e as SEs. É caracterizada por um início agudo de febre alta, erupção cutânea eritematosa difusa, descamação da pele, hipotensão e envolvimento de falhas de três ou mais sistemas orgânicos (ORTEGA et al., 2010). Esta toxina é atualmente aceita como a causa de 100% dos casos de TSS associado à menstruação devido o uso prolongado de tampão vaginal. TSST-1 é o único superantígeno capaz de causar TSS a partir de fonte intravaginal, o que provavelmente é devido à sua capacidade única de atravessar as superfícies mucosas. Das cepas de *S. aureus* isoladas em casos de TSS não associados com o uso de tampões, cerca de 50% produzem TSST-1 (DINGES et al., 2000).

TSST-1 e as SEs são conhecidas como superantígenos (PTSAgs) por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa (DINGES et al., 2000; BALABAN & RASOOLY, 2000). Exibem atividade de superantígenos, ligando-se simultaneamente as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e a receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de células T, os quais prolongam a infecção bacteriana às custas da saúde do hospedeiro humano (BAKER & ACHARYA, 2004).

Os genes codificadores de enterotoxinas estudados têm denominações que iniciam com as letras *se* (de enterotoxina estafilocócica) ou *ent* (de enterotoxina), das quais a primeira forma é a mais utilizada na atualidade. As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por genes presentes em bacteriófago (SEA, SED, SEE e SEJ), plasmídeo (SEH e SEP),

cromossomo (SEH e SEP) e ilhas de patogenicidade cromossomal, a exemplo de SEB, SEC, SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, SEK, SEL e SEQ (OMOE et al., 2002; BLAIOTTA et al., 2004).

Inicialmente, a TSST-1 foi equivocadamente identificada como SEF e por isso não existe a enterotoxina sorotipo F (BECKER et al., 1998). A TSST-1 é codificada pelo gene *tst*, que está na ilha de patogenicidade estafilocócica¹, de 15 a 19 kb, presente no cromossomo bacteriano (RUZIN et al., 2001). É um polipeptídeo de 29,1 KDa, com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas e superantigênicas, porém apenas as SEs têm atividade emética. A proteína madura é uma cadeia polipeptídica com um peso molecular de 22 KDa (DINGES et al., 2000).

3.2.3 Intoxicação alimentar estafilocócica

A intoxicação alimentar é resultado da ingestão de enterotoxina estafilocócica pré-elaborada em substratos alimentícios, em decorrência de microrganismos presentes em densidade populacional situada entre 10^5 a 10^8 UFC/g ou mL. Entretanto, este dado tem variado conforme o autor. Alguns afirmam que é necessária uma população mínima de 10^5 UFC/g no alimento para produzir quantidade suficiente de enterotoxina a fim de causar toxinose (AKHTAR et al., 1996).

Diferentes agentes etiológicos podem contaminar os alimentos, podendo levar a doenças, manifestadas por ação de microrganismos patogênicos ou por suas toxinas. O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitidos aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais (STAMFORD et al., 2006; SIMON & SANJEEV, 2006).

A intoxicação estafilocócica constitui a causa mais freqüente de surtos de DTAs em muitos países e ocorre após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas. A intoxicação alimentar é caracterizada

cl clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarréia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode resultar em desidratação decorrente da perda significativa de líquido e sudorese, geralmente não acompanhada de estado febril. Dor de cabeça e queda da pressão arterial, também podem ocorrer (FREITAS et al., 2004; BORGES et al., 2008a; FREITAS et al., 2009). A intoxicação raramente é letal, sendo que indivíduos idosos são mais susceptíveis do que os jovens. Em determinados casos, a intoxicação alimentar estafilocócica pode causar morte devido a complicações secundárias (BALABAN & RASOOLY, 2000).

Em sua forma biologicamente ativa, as enterotoxinas são termoestáveis. Esta característica das enterotoxinas torna a presença dos estafilococos nos alimentos ainda mais relevante, visto que a pasteurização, apesar de destruir células viáveis, é ineficiente para garantir a segurança alimentar, se houver enterotoxina previamente elaborada (BERGDOLL, 1990).

Entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicação estafilocócica destacam-se o leite cru, o leite pasteurizado e os queijos como os produtos lácteos mais incriminados, sendo o *S. aureus* o microrganismo mais frequente nas investigações epidemiológicas. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende da susceptibilidade do indivíduo, do peso corporal e, especialmente, do estado de saúde da pessoa acometida (BORGES et al., 2008a).

Os mecanismos de ação das enterotoxinas são sugeridos e podem explicar os sintomas causados devido a sua ingestão. Uma vez ingeridas, as enterotoxinas ligam-se aos seus receptores que estão localizados no intestino. O estímulo gerado é transferido através dos nervos vago e simpático até o centro do vômito, induzindo o retroperistaltismo do estômago e do intestino delgado. O outro mecanismo sugerido não está totalmente elucidado, mas parece estar relacionado a uma ativação de um mecanismo secretor de sódio e cloro, provocando um desequilíbrio hidroeletrolítico no intestino, resultando em diarréia (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Vale ressaltar que a simples presença de amostras toxigênicas de *S. aureus* no leite e seus derivados não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, principalmente se for considerado que esse microrganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias dos bovinos, que o leite é um excelente meio de crescimento para *S. aureus*, que a temperatura da glândula mamária é ideal para a produção de toxinas (CARDOSO et al, 2000), que podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo humano, mesmo após pasteurização e processamento na indústria de laticínios (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA), entre 1993 e 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos com acometimento de 4.247 pessoas em 11 países dessa região. Há 16 relatos de surtos veiculados por queijos ocorridos no Brasil, com 86 pessoas acometidas. Dois desses surtos foram notificados no estado do Ceará no ano de 2000, atribuídos ao consumo de queijos e envolvendo 14 pessoas (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

Doenças alimentares têm um grande impacto na saúde pública. Estima-se que, a cada ano, nos Estados Unidos, entre 6 e 80 milhões de pessoas sejam afetadas por essas doenças, causando 9.000 mortes e um custo de, aproximadamente, 5 bilhões de dólares (BALABAN & RASOOLY, 2000). Neste mesmo país, estima-se que os custos médicos e as perdas em produtividade devido à doença alimentar estafilocócica, sejam da ordem de 1,5 bilhão de dólares por ano (CENCI-GOGA et al., 2003).

No período de 1997 a 2002, vários surtos de intoxicação alimentar ocorridos em Minas Gerais foram investigados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O Leite e produtos derivados (queijos canastra, Minas, mussarela e ralado, requeijão e bebida láctea) foram envolvidos em muitos casos. As contagens de *Staphylococcus* spp. nos produtos incriminados variaram de $6,0 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^8$ UFC/g e as principais enterotoxinas estafilocócicas envolvidas nos surtos foram SEA, SEB e SEC (VERAS et al., 2003).

No período de 1995 a 2001, relatórios da FUNED informam que alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *S. aureus* causaram 112 surtos com o envolvimento de 12.820 pessoas e 17 mortes. Diversos tipos de queijos foram responsáveis por 23 desses surtos, com 600 pessoas acometidas e um óbito (CARMO, 2002).

Casman et al. (1967) descreveram que SED é considerada a segunda enterotoxina estafilocócica mais encontrada em intoxicações alimentares, perdendo apenas para SEA. A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade desta enterotoxina (100 a 200 ng) é suficiente para causar doença, especialmente em crianças e idosos (KOKAN & BERGDOLL, 1987).

O caráter autolimitante da doença e a notificação não compulsória levam o Brasil a apresentar índices subestimados de intoxicação alimentar estafilocócica. Devido a sintomatologia branda e de curta duração, os casos e surtos desse tipo de intoxicação raramente levam as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico, fazendo com que o índice de hospitalização, e conseqüente notificação, seja relativamente baixo (SILVA, 1998).

3.2.4 Identificação de *Staphylococcus aureus* e suas toxinas

Para avaliar o papel das enterotoxinas na intoxicação alimentar estafilocócica é necessária a aplicação de testes imunológicos para a detecção das mesmas em alimentos (DOLZANI et al., 1994). Técnicas imunológicas são bastante usadas para a detecção de *S. aureus* e de enterotoxinas estafilocócicas, contudo, sua sensibilidade e especificidade podem variar dependendo da pureza dos reagentes e níveis de expressão da toxina (GILLIGAN et al., 2000).

A detecção de enterotoxinas estafilocócicas no sobrenadante de culturas pelos métodos clássicos de imunodifusão, aglutinação e ELISA é demorado, nem sempre detecta concentrações baixas de toxinas e estão disponíveis comercialmente apenas kit/antisoros para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (ARCURI et al., 2006).

Além disso, com o uso dessas metodologias, existe a possibilidade da obtenção de resultados falsos negativos ou falsos positivos na identificação de *S. aureus* enterotoxigênicos, haja vista que são baseados na avaliação da produção de enterotoxinas (SHARMA et al. 2000).

Nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Na tentativa de se contornar as limitações destas técnicas, métodos baseados nas características genotípicas têm sido desenvolvidos. Segmentos de genes que, embora polimórficos, apresentam estabilidade suficiente para permitir discriminação de isolados não relacionados epidemiologicamente, são amplificados e o padrão de seus produtos é analisado (DINGES et al., 2000).

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, bem como o advento da amplificação in vitro pela PCR, permite obter, rapidamente, grandes quantidades de cópias de um segmento de DNA específico, viabilizando métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucléicos. A aplicação dessa tecnologia originou diversos estudos na busca de métodos mais eficazes para a diferenciação e identificação de microrganismos, revelando-se uma alternativa rápida, sensível e específica na identificação de patógenos e seus genes de enterotoxinas (ZOCHE et al., 2009; ARCURI et al., 2006).

A tecnologia da PCR foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa voltada ao entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (ANTONINI et al., 2004). Esta técnica é uma das ferramentas mais úteis em biologia molecular, pois permite amplificar milhões de vezes um fragmento específico de DNA. Com esta técnica pode-se detectar a presença de uma quantidade mínima de um fragmento específico de DNA (BENDIT et al., 1999).

A vantagem dos métodos baseados em PCR se relaciona à capacidade de detectar genes que determinam a produção das toxinas

estafilocócicas inclusive a partir de alimento tratado por aquecimento, em virtude do DNA permanecer inalterado, demonstrando o potencial de toxigenicidade de *S. aureus* (TSEN & CHEN, 1992).

Devido às informações sobre a seqüência de DNA das SEs (MCLAUHLIN et al., 2000), a PCR torna-se um método para a detecção dos genes destas toxinas, mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos (FREITAS et al., 2004). Métodos baseados em PCR para determinar a ocorrência de microrganismos patogênicos e toxigênicos em alimentos são amplamente reconhecidos como capazes de diminuir o tempo de detecção e aumentar a especificidade e sensibilidade dos resultados (ERCOLINI et al., 2004).

A identificação de *S. aureus* por PCR é baseada na amplificação de genes-alvo altamente conservados dentro da espécie. A exemplo disso, a amplificação do gene *femA* (*factors essential for methicillin resistance*) tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes baseados em pesquisa de DNA, sendo utilizado para a identificação genotípica deste microrganismo, o que permite diferenciá-lo de outras espécies. Esse gene codifica fator essencial para a resistência a meticilina e está universalmente presente em todas as cepas de *S. aureus* (MEHROTA et al., 2000).

Este gene está diretamente envolvido na biossíntese da parede celular bacteriana ou na síntese de fatores associados, o que influencia o nível de resistência a meticilina. O produto deste gene é uma proteína de 48 kDa, que desempenha um papel vital na síntese de peptideoglicano da parede celular de *Staphylococcus* (BENSON et al., 2002). A amplificação do gene *femA* ou parte dele constitui ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus*, sendo portanto alternativa rápida e segura para identificação dessa bactéria (ARCURI et al., 2004; FREITAS, 2005).

A amplificação, pela técnica de PCR, das seqüências codificadoras das SEs (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), ETs (*eta*, *etb*) e TSST-1 (*tst*) constitui técnica simples, rápida e sensível para detecção da presença dessas toxinas (JOHNSON et al., 1991).

A *multiplex* PCR é uma variação da técnica de PCR que permite a utilização de vários pares de iniciadores específicos, para diferentes seqüências-alvo numa mesma reação de amplificação. Este procedimento permite que várias seqüências de uma mesma molécula de DNA sejam lidas, ou ainda, que múltiplos fatores de virulência de um mesmo patógeno sejam pesquisados. A técnica de *multiplex* PCR é utilizada para investigar diferentes genes toxigênicos em isolados de *S. aureus*, obtidos de quadros de intoxicação alimentar, de leite e queijo (ANDRADE, 2008; BORGES et al., 2008a; FREITAS et al., 2009).

A aplicabilidade da técnica de *multiplex* PCR é evidenciada em diversos estudos para caracterização genética de cepas de *S. aureus*, demonstrando ser uma alternativa viável aos métodos imunológicos tradicionais de diagnóstico. Além disso, seu uso pode ser estendido para indústrias de alimentos, assim como ser utilizado como ferramenta no auxílio às investigações epidemiológicas para a elucidação de casos e surtos de intoxicação alimentar (ZOCCHÉ et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e Colheita das Amostras

As amostras foram adquiridas de quatro (04) laticínios inspecionados, localizados no Estado do Maranhão, sendo dois (02) sob responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e dois (02) inspecionados pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Os laticínios foram identificados como:

- Laticínio 01 (SIF) com processamento de queijo tipo mussarela;
- Laticínio 02 (SIF) com processamento de queijo tipo coalho;
- Laticínio 03 (SIE) com processamento de queijo tipo mussarela;
- Laticínio 04 (SIE) com processamento de queijo tipo mussarela.

A colheita das amostras ocorreu no período de junho/2009 outubro/2010. Foram colhidas um total de 120 amostras, sendo 40 de leite cru refrigerado, 40 de leite pasteurizado e 40 de queijo, obtidas de cinco diferentes lotes de produção dos laticínios. Cada lote foi representado por duas (02) amostras de leite cru refrigerado, duas (02) de leite pasteurizado, e duas (02) de queijo da mesma linha de processamento.

As amostras do leite cru refrigerado foram colhidas em frascos estéreis de 250 mL, diretamente do tanque de recepção da indústria, e as amostras de leite pasteurizado foram colhidas diretamente na saída do pasteurizador. As amostras de queijo foram colhidas após embalagem de 250 g, própria dos laticínios e transportadas em caixa isotérmica até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão, onde foram analisadas quanto à pesquisa de *Staphylococcus* spp, quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e identificação fenotípica de *S. aureus*.

4.2 Pesquisa do Gênero *Staphylococcus*

Para a pesquisa de *Staphylococcus* spp, utilizou-se 25 mL do leite (cru refrigerado e pasteurizado) e 25 g de queijo, homogeneizando-as em 225 mL de água peptonada esterilizada, constituindo-se a diluição inicial de 10^{-1} . A partir da qual foram preparadas as diluições seriadas subsequentes até 10^{-3} . Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) foram inoculadas em placas contendo Ágar Baird-Parker (Himedia), suplementado com emulsão de ovo e telurito de potássio (Himedia), distribuídas com alça de Drigalsky e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (SILVA et al, 2001).

Após incubação, as placas contendo de 20 a 200 colônias foram quantificadas, selecionando-se 3 a 5 colônias típicas (negras, brilhantes com halo opaco rodeadas por um halo transparente) e atípicas que foram submetidas a avaliação de suas características morfo-tintoriais pelo método de Gram (CARTER, 1978), apresentando-se como cocos Gram-positivos agrupados em forma de cachos de uva, o que confirma o gênero *Staphylococcus*.

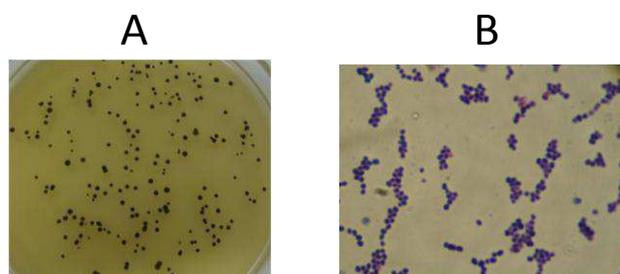


FIGURA 1 – Identificação de *Staphylococcus* spp.

A= Crescimento em Ágar Baird-Parker

B= Coloração de Gram

Fonte: Dados do autor.

4.3 Identificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus*

Para a caracterização fenotípica do microrganismo foram realizados testes bioquímicos de catalase, coagulase livre, DNase, produção de acetoina (Voges-Proskauer), fermentação do manitol (aerobiose e anaerobiose), da maltose e trealose (aerobiose). Os isolados de *Staphylococcus* spp positivos em todos os testes foram classificados como *S. aureus* (MAC FADDIN, 1976; HOLT et al., 1994; APHA, 2001).

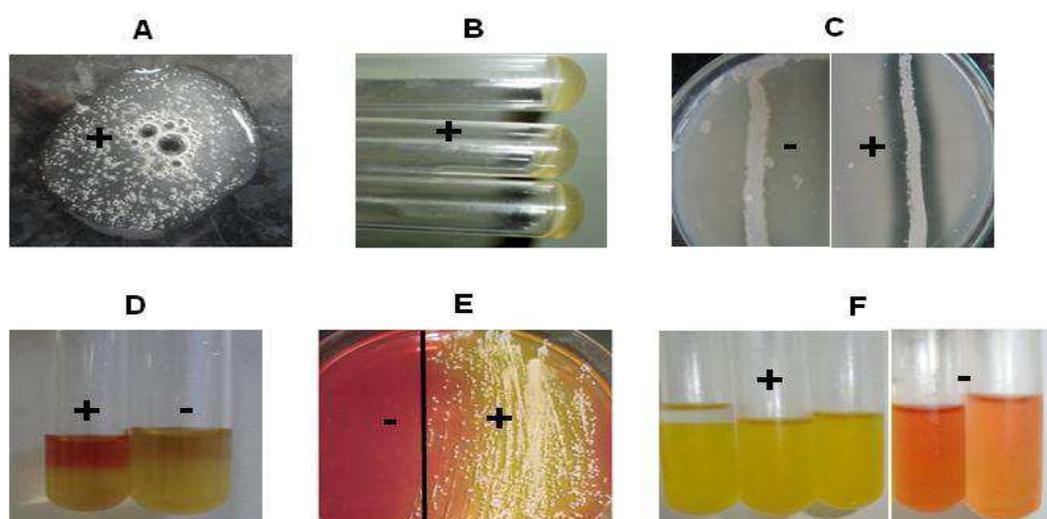


FIGURA 2 – Identificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus*

A = Catalase; B= Coagulase; C= DNase; D= Voges-Proskauer

E= Fermentação aeróbia do manitol; F= Fermentação anaeróbia do manitol e aeróbia da maltose e trealose

Fonte: Dados do autor.

4.3.1 Teste de catalase

As colônias de *Staphylococcus* spp foram cultivadas em caldo BHI (*Broth Heart Infusion*), e após 24 h de cultivo, uma alçada de crescimento foi transferida para uma lâmina de vidro, adicionando-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% sobre o esfregaço. O resultado foi considerado positivo quando as estirpes apresentaram desprendimento de oxigênio através da formação de bolhas.

4.3.2 Teste de coagulase livre em tubo

Somente as colônias que se apresentaram como cocos Gram positivos, dispostos em cachos, e positivos no teste de catalase foram submetidos a prova de coagulase. Em tubos de vidro estéreis, foram adicionados 0,5 mL de plasma de coelho (Laborclin) e 0,3 mL de cultura pura do microrganismo isolado crescido após 24 h de cultivo em caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria, e leituras para a verificação da formação de coágulos foram realizadas uma, duas, três, quatro e 24 h após a incubação das amostras, e os coágulos classificados como: Grau “1+”, coágulos pequenos e desorganizados; Grau “2+”, coágulos pequenos organizados; Grau “3+”, coágulos grandes organizados; Grau “4+”, coagulação completa. A ausência de formação de coágulos foi considerada como resultado negativo.

4.3.3 Teste de DNase

As estirpes positivas no teste de coagulase foram semeadas em Ágar DNase (Himedia) e incubados a 37°C por 24 h. Após o crescimento, adicionava-se HCl 1N na linha de crescimento do microrganismo, e, após aproximadamente 3 minutos realizava-se a leitura. O resultado foi considerado positivo pela formação de halo transparente ao redor da linha de crescimento, indicando a liberação de DNase pela bactéria.

4.3.4 Prova de voges-proskauer

Para verificar a produção da acetoina a partir da glicose, as estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP (Himedia) e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, foi adicionado 0,6 mL de solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Os cultivos que apresentaram coloração vermelha em até 15 min foram considerados positivos.

4.3.5 Teste da utilização do manitol (aerobiose e anaerobiose), maltose e trealose (aerobiose)

As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização ou não de açúcares. Estes testes foram realizados em Ágar-Base Vermelho de Fenol (manitol em aerobiose) e Caldo Vermelho de Fenol (manitol em anaerobiose; maltose e trealose em aerobiose), suplementados com 1% do respectivo carboidrato adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana 0,45 µm de porosidade. Em seguida o microrganismo foi inoculado no meio suplementado e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por até 24 h. A prova foi considerada positiva quando havia viragem do pH do meio de cultura, de vermelho para amarelo, e negativa sem alteração de cor.

4.4 Extração do DNA Genômico de *Staphylococcus aureus*

As cepas com identificação fenotípica foram cultivadas em caldo BHI, a 37°C/24 h e após o período de incubação, 1 mL de cada crescimento foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Axygen) e submetidos a extração do DNA, empregando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega), segundo as instruções do fabricante para isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas.

Os tubos foram centrifugados em rotação máxima (14.000 rpm) por 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas com

480 μ L de EDTA 50mM e 120 μ L de lisozima (Promega®) (10mg/mL em 10mM de Tris-HCl, pH 8.0), sendo incubados a 37°C por 60 minutos. Foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido com 600 μ L de solução de lise do núcleo, sendo incubados a 80°C por 5 minutos para lise das células. Após foram adicionados 3 μ L de RNase, invertendo os tubos 2-5 vezes para homogeneização e incubados a 37°C por 60 minutos.

Após a incubação, adicionou-se 200 μ L da solução de precipitação de proteínas, vortexando os tubos vigorosamente por 20 segundos e em seguida incubados sob refrigeração por 5 minutos. Estes foram centrifugados a 14.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante (DNA livre) transferido cuidadosamente para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Axygen), contendo 600 μ L de isopropanol. Os tubos foram homogeneizados suavemente por inversão até visualização da massa de DNA e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionado 600 μ L de etanol a 70%, invertendo-se os tubos várias vezes para lavar o pellet de DNA. Em seguida foram centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos e o etanol descartado, colocando os tubos em papel absorvente e deixando o pellet de DNA secar por 10-15 minutos. Após esse tempo, 50 μ L de solução de reidratação foi adicionado ao pellet de DNA e os tubos incubados a 65°C por 60 minutos. Após a reidratação, os tubos contendo o DNA foram armazenados a -20°C até a utilização nos ensaios moleculares.

4.5 Confirmação Genotípica das Estirpes de *Staphylococcus aureus*

A confirmação molecular dos isolados de *S. aureus* com caracterização fenotípica foi realizada a partir da amplificação de fragmento de 132pb do gene *femA*, específico de *S. aureus*, com a sequência de oligonucleotídeos descritos por Mehrotra et al. (2000) (**TABELA 1**).

As reações compreenderam volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de reação 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador FEMA-1 e FEMA-2, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µL do DNA molde.

A PCR foi realizada em termociclador (Biocycler), submetida à desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 2 minutos e extensão dos *primers* a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

O produto amplificado foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, observado sob iluminação ultravioleta e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica Sony DSC W210. *Ladder 100 bp* foi utilizado como padrão de peso molecular. Apenas as cepas de *S. aureus* identificadas genotipicamente foram submetidas aos testes seguintes.

4.6 Detecção dos Genes Toxigênicos

A investigação dos genes específicos das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE foi realizada com os oligonucleotídeos descritos por Becker et al. (1998), e para o gene da TSST-1 (*tst*) realizou-se com oligonucleotídeos descritos Mehrotra et al. (2000) (**TABELA 1**). Para tal, duas reações de PCR foram realizadas:

a) *Multiplex* PCR com volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de reação 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 160 µM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada um dos *primers sea, seb, sec, see* e *sed*, 1,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µL do DNA genômico. As amplificações foram programadas para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão);

b) *Uniplex* PCR com volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de reação 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (TSST-1 e TSST-2), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µL do DNA molde. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

O volume final do mix das reações foi ajustado com água estéril qualidade PCR. Dez microlitros do produto amplificado foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. As condições de eletroforese foram de 150V por 2 horas, ao final observado sob iluminação ultravioleta e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica Sony DSC W210. Cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus*, ATCC 13565 portadora do *sea*, ATCC 14458 do gene *seb*, ATCC 19095 do gene *sec*, ATCC 23235 do gene *sed* e ATCC 27664 do gene *see*, cedidas gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foram utilizadas como controle positivo das reações.

TABELA 1 - Sequência dos nucleotídeos e tamanho dos produtos da PCR dos genes investigados nos isolados de *Staphylococcus aureus*

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)*
<i>sea</i> **	SEA-3	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA-4	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
<i>seb</i> **	SEB-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB-4	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
<i>sec</i> **	SEC-3	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC-4	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
<i>sed</i> **	SED-3	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED-4	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
<i>see</i> **	SEE-3	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE-2	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
<i>tst</i> ***	TSST-1	ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC	326
	TSST-2	TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC	
<i>femA</i> ***	FEMA-1	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132
	FEMA-2	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	

*Pares de base; **Becker et al. (1998); ***Mehrotra et al. (2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 130 colônias de SCP isoladas das amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijo, obtidas nos quatro laticínios. Na **TABELA 2** podem ser verificadas as contagens de SCP, bem como o percentual de cepas de *S. aureus* identificados fenotipicamente em cada tipo de amostra.

Identificou-se fenotipicamente, 60 cepas de *S. aureus*, das quais 54 (90%) foram isoladas das amostras de leite cru refrigerado. Das amostras de leite pasteurizado, não ocorreu isolamento deste patógeno. Quanto as amostras de queijo isolaram-se seis (10%) cepas de *S. aureus*, sendo uma obtida do queijo coalho e cinco do queijo tipo mussarela. Observou-se que o maior percentual de isolados de *S. aureus* foi obtido das amostras de leite cru refrigerado, resultado esperado, pois todas as amostras apresentaram elevado crescimento de SCP com contagens entre $1,7 \times 10^4$ a $>10^6$ UFC/mL.

Esta elevada contaminação pode ter ocorrido pelo fato do leite cru ser um alimento suscetível a contaminação, principalmente durante seu processo de obtenção, onde o ordenhador pode contaminá-lo com bactérias das próprias mãos, dos utensílios, equipamentos e até mesmo de um animal para outro, caso esteja ocorrendo mastite no rebanho. Além disso, o armazenamento e a temperatura inadequados durante o transporte da propriedade até o laticínio é outro fator que pode contribuir para a multiplicação da microbiota contaminante obtida no momento da ordenha.

Corroborando com os achados da presente pesquisa, Borges et al. (2008b) verificaram que as amostras de leite cru refrigerado provenientes de um laticínio, em Fortaleza-CE, apresentou 100% de contaminação por SCP com valores entre 10^3 e 10^6 UFC/mL. No Brasil, um dos principais motivos do aumento da contagem de microrganismos no leite cru é a dificuldade de ajuste entre os horários de término da ordenha e da coleta do leite. Vários problemas surgem quando a ordenha não foi completada ou quando terminou imediatamente antes da coleta, em que o leite não foi suficientemente resfriado

à temperatura necessária e o transporte ocorre em temperatura mais elevada (CERQUEIRA et al., 2010).

Vale ressaltar que os laticínios objetos deste estudo recebem leite de diferentes produtores, sendo misturado no tanque de recepção, independente de sua origem, o que amplia a possibilidade de contaminação do leite cru refrigerado. Mesmo que a obtenção do leite da maioria das propriedades tenha ocorrido com higiene e de animais sadios, com manipulação, refrigeração e transporte adequados, ainda assim, a matéria-prima pode apresentar considerável número de bactérias patogênicas, face àquelas propriedades com procedimentos inadequados na obtenção e transporte do leite.

Apesar da legislação vigente não estabelecer limites para presença de microrganismos patogênicos no leite cru refrigerado, vários são os estudos que afirmam que contagens a partir de 10^5 UFC/mL de SCP é suficiente para a produção de enterotoxinas em alimentos (LE LOIR et al., 2003; BORGES et al., 2008b; SANTANA et al., 2010a). Portanto, as contagens encontradas nesta pesquisa podem representar um grande risco de presença de SEs no leite cru refrigerado, podendo chegar até o queijo, mesmo após o processo de pasteurização que elimina as bactérias, mas não destrói as toxinas.

Isso ocorre devido à termoestabilidade das SEs que resistem ao calor de até 100°C por 30 minutos, permanecendo ativas nos alimentos mesmo após seu processamento térmico (BALABAM & RASSOLI, 2000), causando intoxicação alimentar caracterizada pela gastroenterite.

TABELA 2 – Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e percentual de *Staphylococcus aureus* com identificação fenotípica em amostras de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e queijos, 2011

Laticínio	Lote	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo		
		UFC/mL ou g		
		Leite cru refrigerado	Leite pasteurizado	Queijo
01 SIF	1	$2,5 \times 10^5$	-	$3,4 \times 10^4$
	2	$2,2 \times 10^6$	-	$6,5 \times 10^3$
	3	$> 10^6$	$2,2 \times 10^2$	$2,7 \times 10^3$
	4	$> 10^6$	$7,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
	5	$> 10^6$	-	2×10^4
02 SIF	1	$4,9 \times 10^4$	-	$> 10^6$
	2	$2,8 \times 10^5$	-	$> 10^6$
	3	$1,7 \times 10^4$	6×10^4	$> 10^6$
	4	$7,5 \times 10^6$	-	$> 10^6$
	5	$1,2 \times 10^5$	-	$8,9 \times 10^4$
03 SIE	1	$1,9 \times 10^5$	-	$6,2 \times 10^3$
	2	$7,6 \times 10^5$	-	$5,8 \times 10^3$
	3	$1,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$
	4	$> 10^6$	-	$5,4 \times 10^3$
	5	$> 10^6$	-	$2,7 \times 10^3$
04 SIE	1	10^5	-	$4,8 \times 10^3$
	2	$8,5 \times 10^4$	-	$1,5 \times 10^4$
	3	$> 10^6$	-	$4,5 \times 10^4$
	4	$> 10^6$	-	$6,6 \times 10^3$
	5	$9,2 \times 10^4$	-	4×10^5
Isolados de <i>S. aureus</i> com Caracterização fenotípica		54 (90%)	-	06 (10%)

*Unidades formadoras de colônia; - ausência.

Quanto ao leite pasteurizado, apenas um pequeno número de amostras apresentaram contaminação por SCP e não foi isolado *S. aureus*, sugerindo que o processo de pasteurização nos quatro laticínios é eficiente em relação ao binômio tempo x temperatura. Porém, deve ter ocorrido falhas na temperatura de pasteurização ou esta não foi suficiente para eliminar toda carga bacteriana, devido à elevada população inicial presente na matéria-prima, ressaltando a importância desta ferramenta no processamento do leite e derivados. Embora o processo de pasteurização assegure a destruição das linhagens de *S. aureus* originalmente presentes no leite cru, essa bactéria poderá ser encontrada em leite pasteurizado, se houver alguma falha durante o processamento e/ou acondicionamentos em temperatura inadequada (CORBIA et al., 2000).

Em um estudo realizado no Estado de São Paulo, 38 (70,4%) das 54 amostras de leite cru apresentaram concentrações de até $8,9 \times 10^5$ UFC/mL de SCP. O leite pasteurizado apresentou oito amostras com contagens de até $8,7 \times 10^3$ UFC/mL (RALL et al., 2008), valores inferiores a esta pesquisa que observou contagens de até $>10^6$ e $3,2 \times 10^4$ UFC/mL para o leite cru refrigerado e pasteurizado, respectivamente.

Quanto as amostras de queijo coalho e mussarela, as contagens de SCP variaram entre $2,7 \times 10^3$ e $>10^6$ UFC/g, onde seis (06) isolados foram classificados como *S. aureus*. Apesar do baixo isolamento de cepas de *S. aureus*, as contagens elevadas representam riscos à saúde do consumidor, pois outras espécies de SCP também podem produzir toxinas. Vale ressaltar que todas as amostras estavam fora dos padrões exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2001), que estabelece contagens para o queijo coalho e mussarela de até 5×10^2 UFC/g e 10^3 UFC/g, respectivamente, e, portanto, não houve diferença na qualidade do produto final em relação ao tipo de inspeção dos laticínios. Resultados divergentes foram encontrados por Oliveira et al. (2010) que observaram diferenças na qualidade do queijo coalho comercializado no Estado de Pernambuco quanto ao tipo de inspeção, onde 79,41% dos queijos de coalho sob inspeção estadual estavam impróprios para

o consumo humano e as amostras sob inspeção federal, apresentaram contaminação em nível tolerável.

A elevada contaminação dos queijos demonstra falhas no seu processamento, indicando que esta etapa é um ponto crítico a ser considerado na linha de processamento de todas as indústrias avaliadas nesta pesquisa. A contaminação pós-pasteurização ocorre principalmente por manipulação inadequada, falta de higiene, deficiência na limpeza e higienização dos equipamentos e utensílios utilizados na produção do queijo. Pelisser et al. (2009) ressaltam que uma das principais fontes de contaminação por SCP em queijos são as mãos e antebraços dos manipuladores devido ao deficiente controle higiênico sanitário e ainda, a não utilização de luvas durante o processamento.

Pelos dados obtidos nesta pesquisa, verifica-se que a matéria-prima é o elemento fundamental para a indústria de laticínios, pois dependendo da sua origem, a qualidade do produto final pode ser comprometida. Aliado a qualidade do leite, manipuladores treinados e a adoção das Boas Práticas de Fabricação são essenciais para a elaboração de um produto final à luz dos padrões de qualidade microbiológicos exigidos pela legislação vigente.

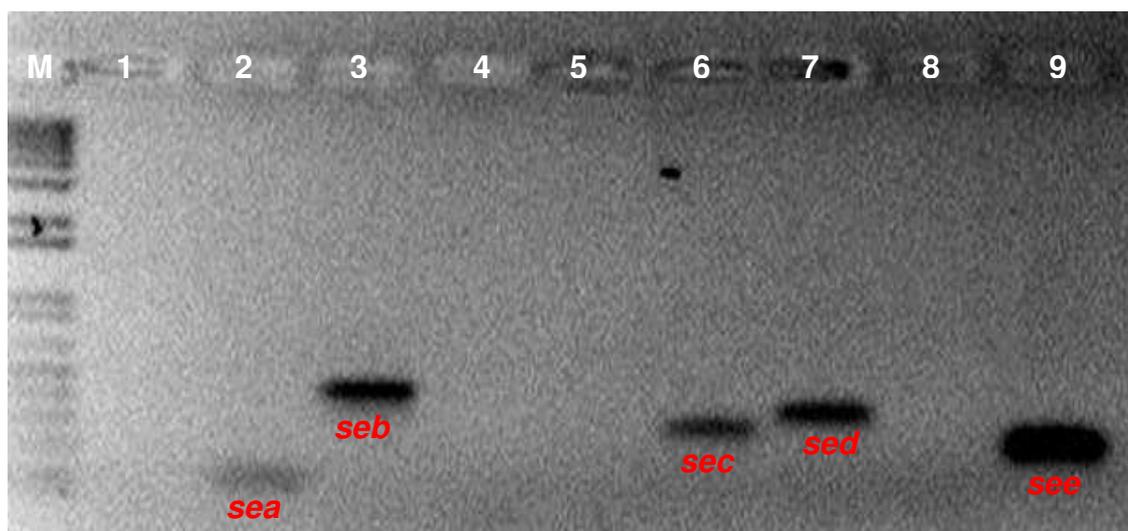


FIGURA 3 – Produtos de amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nas cepas referência de *S. aureus* através de *uniplex* PCR. Gel de agarose a 1%. Linha **M**: marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen, Brasil); Linha **2**: *sea*, 127pb; Linha **3**: *seb*, 477pb; Linha **6**: *sec*, 271pb; Linha **7**: *sed*, 319pb; Linha **9**: *see*, 178pb; Linhas **1,4,5,8**: controle negativo.

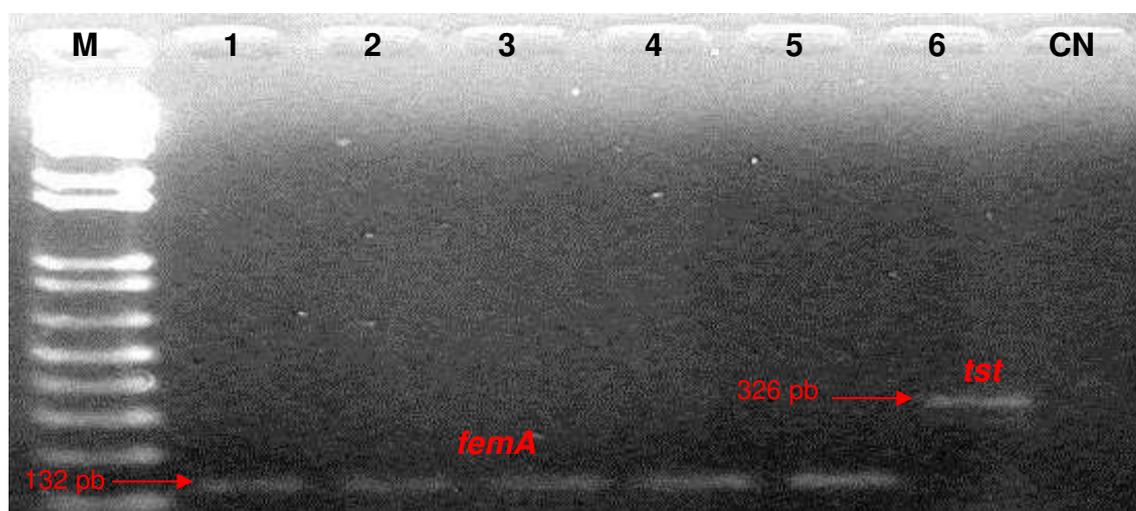


FIGURA 4 – Produtos de amplificação dos genes *femA* e *tst* nas cepas referência de *S. aureus* através de *uniplex* PCR. Gel de agarose a 1%. Linha **M**: marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen, Brasil); Linha **1-5**: *femA*, 132pb: **1** ATCC 13565, **2** ATCC 14458, **3** ATCC 19095, **4** ATCC 23235, **5** ATCC 27664; Linha **6**: controle positivo do gene *tst*, 326pb; Linha **CN**: controle negativo.

Para validar os protocolos de PCR utilizados na investigação dos genes de toxinas, cada oligonucleotídeo dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* foram testados individualmente com o DNA dos controles positivos para verificar a especificidade dos primers reconstituídos (**FIGURA 3**). O mesmo procedimento foi adotado para os oligonucleotídeos do gene *tst* responsável pela produção da TSST-1, e do gene *femA*, específico para a espécie *S. aureus* (**FIGURA 4**). Os produtos obtidos foram específicos para cada um dos genes pesquisados, validando a eficácia dos protocolos de PCR realizados neste trabalho.

Das 60 estirpes de *S. aureus* caracterizadas fenotipicamente, 46 (76,7%) amplificaram o fragmento de 132pb do gene *femA* específico para *S. aureus*, sendo 41 cepas oriundas do leite cru refrigerado, uma do queijo coalho e quatro do queijo mussarela (**TABELA 3**).

TABELA 3 – Número de cepas de *S. aureus* com caracterização fenotípica e genotípica (*femA*) em amostras de leite cru refrigerado e queijos, 2011

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Tipo de amostra	Caracterização fenotípica	Caracterização genotípica (<i>femA</i>)
Leite cru refrigerado	54	41
Queijo coalho	01	01
Queijo mussarela	05	04
TOTAL	60 (100%)	46 (76,7%)

Os resultados demonstram que a análise genética apresenta melhor especificidade para a confirmação definitiva dos isolados de *S. aureus*, demonstrando seu maior poder discriminatório na identificação deste microrganismo.

Costa et al. (2010) verificou que das 338 cepas de *S. aureus* caracterizadas por testes bioquímicos, 336 foram confirmadas pela amplificação o gene *femA*, havendo elevada correlação entre o teste genotípico e fenotípico. Em uma pesquisa realizada em propriedades leiteiras de

diferentes municípios de Minas Gerais foram isoladas 100 cepas de SCP, das quais 77 foram caracterizados como *S. aureus* por testes bioquímicos. Quando os 100 isolados foram submetidos à identificação genotípica de *S. aureus*, 83 cepas apresentaram amplificação do gene *femA* (LANGE et al., 2011).

Vários são os estudos que têm explorado este gene como marcador específico para identificação genotípica de *S. aureus* (MEHORTA et al., 2000; RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2000; ARCURI et al., 2006; FISCHER et al., 2009; PELISSER et al., 2009; BORGES et al., 2009), pois este gene participa da biossíntese da ponte interpeptídica de pentaglicina que é característico para o peptidoglicano da parede celular deste microrganismo (JOHNSON et al., 1995; MOUSSALLEM et al., 2007;).

Nesta pesquisa e em outros trabalhos verifica-se que caracterização fenotípica de *S. aureus* não apresenta especificidade 100% satisfatória, o que pode ser obtido com o estudo molecular de marcadores específicos do microrganismo, como foi realizado neste trabalho através da amplificação do gene *femA*.

Para a identificação de genes toxigênicos foi realizada uma *uniplex* PCR para investigação do gene *tst* e uma *multiplex* PCR para investigação dos genes das SEs clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, e *see*). O controle positivo da *multiplex* PCR foi obtido com o mix de DNA das cepas referência, onde foi observada amplificação específica dos cinco genes das SEs clássicas demonstrando a aplicabilidade da reação para pesquisa de diferentes genes alvo (**FIGURA 5**).

Verificou-se que a utilização da *multiplex* PCR para a investigação simultânea de diferentes genes toxigênicos, diminuiu o tempo e os custos da pesquisa, pois somente duas reações foram realizadas para cada um dos isolados de *S. aureus*. Se fossem efetuadas reações individuais com o DNA das 46 cepas, para cada um dos genes investigados, seriam necessárias 276 PCRs. Mas quando a pesquisa de cinco genes foi incluída na mesma reação (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), deixando apenas um (*tst*) para investigação individual, apenas 92 PCRs foram realizadas.

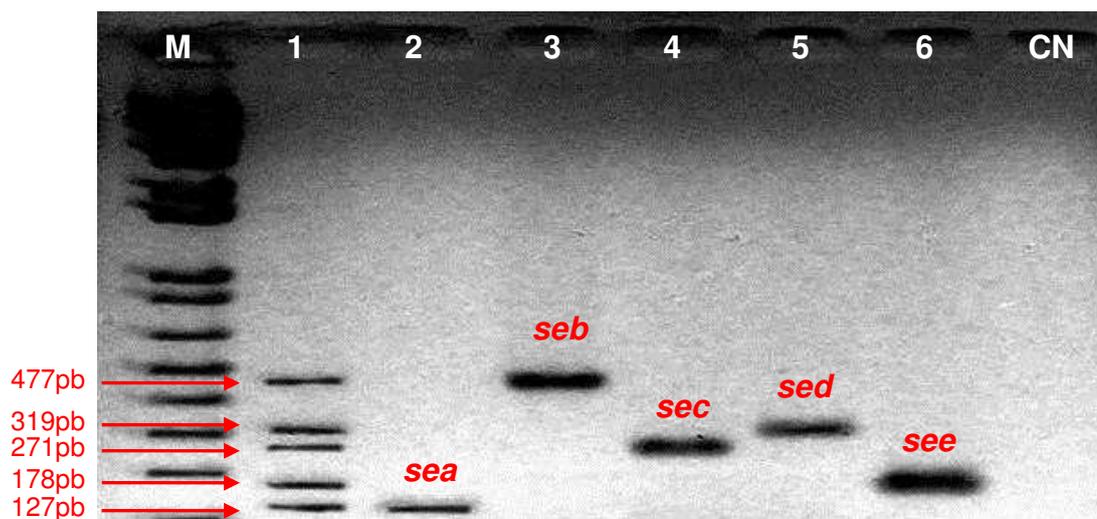


FIGURA 5 - Produtos de amplificação simultânea dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* das cepas referência de *S. aureus* através de *multiplex* PCR. Gel de agarose a 1%. Linha **M**: marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen, Brasil); Linha **1**: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, simultaneamente; Linha **2**: *sea*; Linha **3**: *seb*; Linha **4**: *sec*; Linha **5**: *sed*; Linha **6**: *see*; Linha **CN**: controle negativo.

A pesquisa dos genes toxigênicos pela *uniplex* e *multiplex* PCR demonstrou que dos 46 isolados de *S. aureus* com identificação genotípica, 34 (74%) apresentaram genes responsáveis pela produção de toxinas e 12 (26%) foram negativos para todos os genes. Dos isolados do leite cru refrigerado, 31 apresentaram amplificação para algum dos genes de toxinas pesquisados. A única cepa isolada do queijo coalho não amplificou nenhum dos genes, e três obtidas do queijo mussarela expressaram algum gene de toxina (**TABELA 4**).

As pesquisas que vêm sendo realizadas têm demonstrando considerável percentual de *S. aureus* portadores de genes toxigênicos. No Tennessee, ao serem avaliadas 78 cepas de *S. aureus* isolados de leite de duas fazendas quanto à frequência de 16 genes de enterotoxinas (*sea-see* e *seg-seq*) e do gene *tst*, 73 (93,6%) foram positivos para um ou mais genes, sendo observado 36 grupos genotípicos distintos (SRINIVASAN et al., 2006). Na Itália, um estudo com 112 cepas de *S. aureus* isolados de leite e derivados, 75 (67%) foram positivas para presença de algum dos genes da SEs (*sea-see* e *seg-seq*), divididos em 17 perfis genotípicos (MORANDI et al., 2007).

Levando em consideração que neste estudo, somente seis genes foram investigados, observa-se que o percentual de *S. aureus* portador de

genes que codificam toxinas é elevado, sugerindo que um grande número de cepas circulantes deste patógeno sejam toxigênicas, o que explica os inúmeros casos de intoxicação alimentar e outras infecções envolvendo este microorganismo. Neste trabalho não foram pesquisados outros genes de toxinas como *eta*, *etb* e os das enterotoxinas descobertas mais recentemente (*seg-seu*), o que poderia elevar o número de cepas toxigênicas identificadas.

TABELA 4 – Perfil genotípico das 46 cepas de *S. aureus* isolados do leite cru refrigerado e queijos, com caracterização genotípica (*femA*), quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst*, 2011

Perfil genotípico	LCR*	Queijo coalho	Queijo mussarela	Total
<i>seb</i>	02	-	-	
<i>sec</i>	03	-	-	
<i>sed</i>	04	-	-	
<i>see</i>	02	-	-	
<i>tst</i>	07	-	03	
<i>seb</i> + <i>sec</i>	02	-	-	
<i>seb</i> + <i>sed</i>	01	-	-	34 (74%)
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i>	01	-	-	
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>tst</i>	01	-	-	
<i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i>	04	-	-	
<i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>tst</i>	01	-	-	
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>tst</i>	02	-	-	
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>see</i>	01	-	-	
Cepas negativas	10	01	01	12 (26%)
Total de <i>S. aureus</i> (<i>femA</i>)	41	01	04	46 (100%)

*leite cru refrigerado

A **TABELA 4** também mostra o resultado dos testes da PCR para a presença dos genes que codificam as SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e para a TSST-1, dos 34 (74%) isolados de *S. aureus* que amplificaram um ou mais genes de toxinas. Os três isolados do queijo mussarela amplificaram apenas o gene responsável pela produção da TSST-1. Não ocorreu amplificação isolada do gene *sea*, como observado para *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst*, ocorrendo somente em associação com estes genes.

Todos os genes das SEs clássicas foram amplificados, assim como o gene da TSST-1, constatando-se 13 grupos genotípicos distintos para a presença dos genes toxigênicos, revelando um número elevado de genótipos, o que indica grande heterogeneidade genética entre os isolados.

Ao contrário dos dados obtidos nesta pesquisa, um estudo avaliando 94 isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite e queijo coalho da Região Agreste do Pernambuco, verificou que nenhuma das cepas comportava os genes das SEs clássicas nem da TSST-1, porém observou a presença de genes das SEs descobertas mais recentemente, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, em 88 cepas (LUZ, 2009) com 10 genótipos distintos. Freitas et al. (2009) verificaram que nos 20 *Staphylococcus* spp isolados do queijo coalho, não houve a presença dos genes para as toxinas SEA, SEB e SEE, porém detectaram a presença dos genes das toxinas SEC, SED, TSST-1, SEG, SEH, SEI e SEJ.

A diferença da ocorrência de genes toxigênicos entre os estudos que vêm sendo realizados, pode ser devido à distribuição geográfica ou da origem ecológica das cepas, bem como da sensibilidade dos métodos de detecção, número e tipos de amostras (BOYNUKARA et al., 2008; LUZ, 2009; FAGUNDES et al., 2010).

Neste estudo, o genótipo mais frequente foi *tst*, presente em 10 (29,4%) cepas de *S. aureus*, seguido pelo genótipo *sed* e *seb+sec+sed* (4 cepas cada, 11,8%), *sec* (3 cepas, 8,8%), *seb*, *see*, *seb+sec* e *sea+seb+sec+tst* (2 cepas cada, 5,8%), *seb+sed*, *sea+seb+sec*, *sea+sec+tst*, *seb+sec+tst* e *sea+seb+sec+sed+see* (2 cepas cada, 3%). O genótipo *tst* que codifica a produção da TSST-1, foi predominante nas cepas de *S. aureus*. Este gene também esteve presente em outros perfis genotípicos, associado a dois e até

três genes das SEs clássicas. Cardoso et al. (2000) e Zafalon et al. (2009) sugeriram uma relação entre a presença de *S. aureus* portador do gene *tst* com vacas acometidas por mastite e geralmente associado aos genes das SEs, onde a produção da TSST-1 parece ter grande importância na virulência das amostras de *S. aureus*, influenciando a gravidade dos casos de mastite.

Um trabalho realizado com os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst* pesquisados em 150 cepas de *S. aureus* isoladas de leite oriundo de casos de mastite bovina, *sea* foi o genótipo mais frequente com 53,6%, seguido de *tst* com 14,3% (FERREIRA et al., 2008). A presença de *S. aureus* portador de *tst* no leite cru refrigerado e no queijo sugere que estes isolados sejam oriundos de vacas acometidas por mastite, já que a TSST-1 tem sido associada ao agravamento do processo inflamatório desta enfermidade no gado leiteiro. Apesar desta toxina ser reconhecida como a principal causa da TSS em seres humanos, principalmente em casos menstruais, mais trabalhos devem ser realizados para melhor avaliar a presença deste gene em *S. aureus* isolados de alimentos.

Na presente pesquisa, dentre as 34 estipes *S. aureus* toxigênicas, 21 (61,8%) apresentaram apenas um gene, três (8,8%) amplificaram dois genes, sete (20,6%) amplificaram três genes, duas (5,8%) amplificaram quatro e uma (3%) era portadora dos cinco genes das SEs clássicas. Este resultado é preocupante, pois 13 (38,2%) isolados de *S. aureus* apresentaram perfil genotípico com presença simultânea de dois a cinco genes toxigênicos, demonstrando o elevado potencial patogênico destas cepas para a produção de toxinas, principalmente, devido às elevadas contagens que foram observadas em todas as amostras de leite cru refrigerado e queijo.

Um estudo conduzido em São Paulo com 132 cepas de *S. aureus* isolados de leite cru, investigando a presença de genes das SEs e TSST-1 e a produção das respectivas toxinas, 90 (68,18%) foram positivos para um ou dois genes de toxinas e 40 (44,44%) isolados foram capazes de produzi-las “*in vitro*” (CHAPAVAL et al., 2006). A presença de elevado percentual de isolados contendo diferentes genes toxigênicos é preocupante para a saúde do

consumidor pela possibilidade de produzirem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares (FREITAS et al., 2009).

Santana et al. (2010b) relataram que o risco de intoxicação estafilocócica requer a presença de quatro fatores: o alimento deve conter estafilococos portadores de genes de toxinas e com a capacidade de expressar esse gene, as contagens do microrganismo devem ser superiores a 10^5 UFC/mL e deve haver condições que proporcionem a produção de toxinas no alimento.

Cepas de *S. aureus* portadoras de genes toxigênicos, não indicam obrigatoriamente a produção de toxinas em nível suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar e outras infecções, pois a produção pode ser influenciada pelo pH, temperatura, atividade de água, tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e atmosfera (CARDOSO et al., 2000; LE LOIR et al., 2003; CHAPAVAL et al., 2006; NADER FILHO et al., 2007; LUZ, 2009). Entretanto, a presença destes genes é necessária para que o microrganismo seja capaz de produzir toxinas, e a técnica da PCR permite justamente avaliar o potencial genético para esta produção, servindo inclusive como teste de triagem para confirmação da presença destas em ensaios imunológicos (ZAFALON et al., 2009).

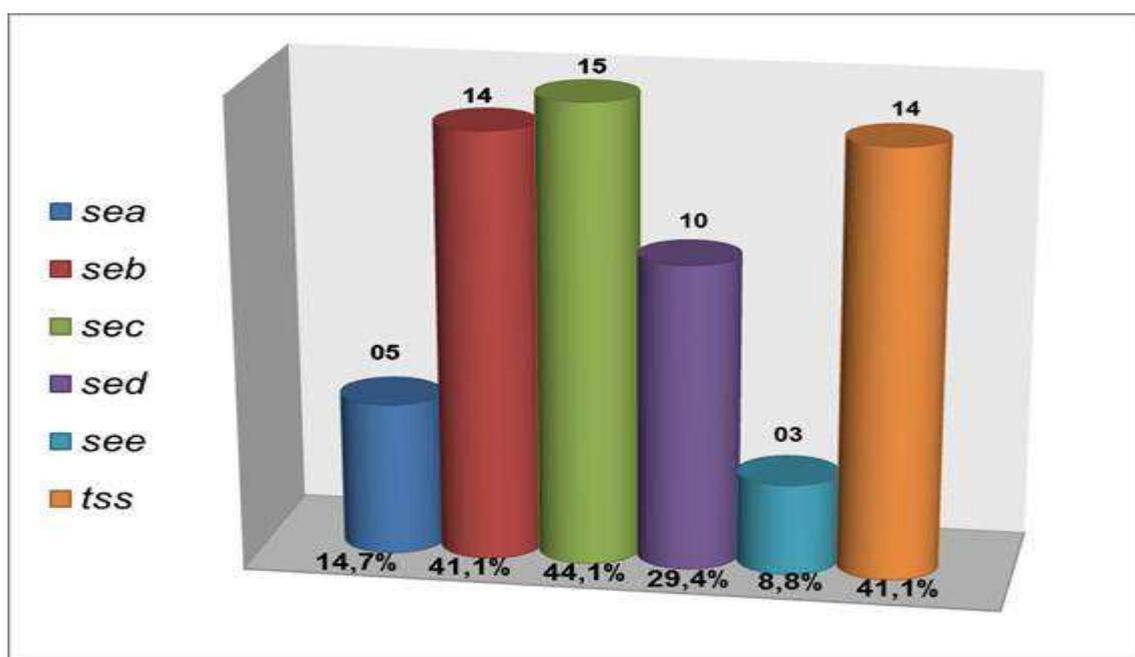


FIGURA 6 – Frequência dos genes das SEs clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *se*, *see*) e da TSST-1 (*tst*) nos 34 isolados de *S. aureus* portadores de genes toxigênicos, 2011.

Na **FIGURA 6** pode ser observada a frequência de cada um dos genes toxigênicos investigados, independente de sua amplificação única ou concomitante, onde *sec* foi o gene mais frequente em 15 (44,1%) cepas, seguido por *seb* e *tst* cada um presente em 14 (41,1%), *sed* em 10 (29,4%), *sea* em cinco (14,7%), e por último *see* que estava presente em três (8,8%) cepas de *S. aureus*.

Nesta pesquisa o gene da SEC foi o mais prevalente com 15 (44,1%) isolados, concordando com o estudo realizado na Suíça em leite de cabra e ovelha, onde 65,2% das cepas positivas para a presença de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas, *sec* foi o mais prevalente (42%) entre os genes das SEs clássicas (SCHERRER et al., 2004). Na Alemanha um trabalho com 34 cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes fazendas leiteiras que amplificaram algum gene (*sea-see* e *tst*), o gene *sec* também foi o mais frequente em 22 (64,7%) isolados, seguido pelo gene *tst* em 19 (55,8%) (ZSCHÖCK et al., 2000).

Resultados divergentes são apresentados por Rall et al. (2008) ao verificarem que das 57 cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru e pasteurizado,

39 (68,4%) foram positivas para pelo menos um gene de enterotoxina, onde o gene da SEA foi o mais frequente, ocorrendo em 16 isolados (41%), seguido de oito cepas positivas para SEC (20,5%), cinco (12,8%) para SED, três para SEB (7,7%) e duas (5,1%) para SEE.

Chapaval et al. (2006) também observaram que o gene *sea* foi o mais frequente nos 90 isolados de *S. aureus*, presente em 61 (67,78%) cepas, seguido por *tst* em 38 (42,22%), *seb* em 30 (33,33%), *sec* em cinco (5,56%), não ocorrendo amplificação dos genes *sed* e *see* em nenhum dos isolados.

As enterotoxinas estafilocócicas mais frequentemente isoladas de surtos de intoxicação alimentar são a SEA e SED (ATANASSOVA et al., 2001). Nos Estados Unidos, SEA tem sido a enterotoxina mais implicada, envolvida em 77,8% de todos os surtos, seguido por SED (37,5%) e SEB (10%) (MATHIEU et al., 1991).

As enterotoxinas SEA e SEB têm sido associadas a contaminação por manipuladores de alimentos, enquanto que SEC e SED estão relacionadas com contaminação de origem animal, principalmente bovinos e suínos (NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003). Estas informações sugerem novamente, que a maioria das cepas de *S. aureus* toxigênicas isoladas neste trabalho possam ser oriundas de contaminação animal, pois o gene *sec* foi o mais frequente nas cepas toxigênicas, assim como o gene *tst* que tem sido associado a cepas de *S. aureus* envolvidas nos casos de mastite.

Embora os surtos de intoxicação estafilocócica sejam atribuídos mais comumente à ingestão de SEA e muitos trabalhos demonstrem a prevalência do seu respectivo gene, os dados desta pesquisa demonstraram que *sea* foi um dos menos frequentes, presente em apenas cinco (14,7%) das 34 cepas toxigênicas de *S. aureus*, sugerindo que há realmente uma distribuição geográfica dos isolados. Entretanto, por se tratar de pesquisa inédita no Estado do Maranhão, outros estudos devem ser realizados para avaliar a prevalência dos genes investigados neste trabalho, assim como dos genes de outras toxinas que também podem ser produzidas por *S. aureus*.

6 CONCLUSÕES

- Todas as amostras de leite cru refrigerado e queijos dos quatro laticínios apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, demonstrando qualidade higiênico-sanitária insatisfatória e com risco à saúde pública pela possibilidade da presença de toxinas;
- A análise molecular do gene *femA* para identificação da espécie *S. aureus*, apresentou melhor especificidade em relação aos testes fenotípicos;
- Todos os genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) e o gene da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram identificados nas cepas de *S. aureus* toxigênicas, as quais apresentaram elevada heterogeneidade genética;
- Os isolados de *S. aureus* demonstraram potencial genético para a produção de uma ou mais toxinas pela presença simultânea de até cinco genes toxigênicos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os serviços de inspeção estadual e federal devem adotar medidas rígidas quanto ao controle da qualidade dos queijos produzidos no Estado do Maranhão, pois os resultados encontrados apontam falhas de ordem tecnológica e do sistema de fiscalização realizado nesses estabelecimentos.

A *multiplex* PCR se mostrou eficaz e exeqüível para investigação simultânea de cinco diferentes genes com elevada relação custo x benefício, apresentando potencial para ser empregada na rotina laboratorial para investigação de diferentes microrganismos patogênicos ou de seus fatores de virulência.

Muitos outros trabalhos devem ser realizados no Estado do Maranhão, em relação às espécies de *Staphylococcus* portadoras de genes toxigênicos, isoladas tanto de alimentos de origem animal e de seus manipuladores, bem como das enfermidades que acometem os animais de produção, a fim de gerar informações sobre a epidemiologia das doenças causadas por este patógeno, possibilitando a adoção de medidas preventivas e de cura.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, M.; PARK, C. E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of Staphylococcal enterotoxin A from heat—processed foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3274-3276, set, 1996.

ANDRADE, M. A.; DIAS FILHO, F. C.; MESQUISTA, A. J.; ROCHA, P. T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C., 676 p, 2001.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 105-113, 2001.

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A. A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 5, p. 959-964, set, 2001.

ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004.

ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de Biologia Molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 49 p.

ARCURI, E. F.; GILMARA, B. P.; BORGES, M. F.; ANGELO, F. F.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. PCR Multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. In: II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006, Goiânia. **Anais...** Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006.

ANDRADE, M. A. Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. 2008. 124p. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2008.

BERGDOLL, B. M. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**: Supplement, Oxford, v. 19, p. 1S-8S, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 3977, 11 mar. 1996. Seção 1.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxina genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, set, 1998.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, v. 2, n. 3, p. 4-11, 1999.

BENDIT, I.; GIGLIO, A. D.; NETO, D. G. Conceitos básicos de biologia molecular – parte II. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, Recife, n. 5, p. 32, 1999.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 02 de janeiro de 2001, seção I, p. 45-53, 2001.

BUYSER M. L. D, DUFOUR B.; MAIRE M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.

BENSON, T. E.; PRINCE, D. B.; MUTCHLER, V. T.; CURRY, K. A.; HO, A. M.; SARVER, R. W.; HAGADORN, J. C.; CHOI, G. H.; GARLICK, R. L. X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* FemA. **Structure**, v. 10, p. 1107-1115, agosto. 2002.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 384-404, 2003.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *sel* in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

BAKER, M. D.; ACHARYA, R. Superantigens: structure-function relationships. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 293, p. 529-537, 2004.

BERNARDO, W. L. C.; BORIOLLO, M. F. G.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.47, p. 19-24, 2005.

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, 2008a.

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. 05, p. 1431-1438, ago. 2008b.

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H.; Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 209–211, 2008.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; PORTO, B. C.; FIGUEIREDO, E. A.T.; ARCURI, E. F. Pesquisa do gene *femA* em *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Ipojuca. **Resumos...** Ipojuca: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 6, p. 1875-1882, dez, 1967.

CARTER, G.R. **Diagnostic procedures in veterinary microbiology**. 2ed. Illinois: Charles C.Thomas. 1978.

CROSSLEY, K. B. **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A.R; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B.; GARINO JR, F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Napgama**, ano II, n.2, mar/abr, 1999.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.

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 Agrobiologia, dez. 2000. 15p.

CARVALHO, L. de A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, K.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Sistema de produção de leite (Cerrado). **Embrapa Gado de leite**, 2002. <Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 20/10/2009.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 9-14, jan/fev, 2002.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1693-1696, 2003.

CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Use of PCR to Detect Classical Enterotoxins Genes (*ent*) and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from Crude Milk and determination of Toxin Productivities of *S. aureus* isolates Harboring These Genes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 165-169, abr./jun., 2006.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, p. 23-32, 2007.

CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus* através do leite e seus derivados, bem como elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**. Duque de Caxias, v. 2, n. 1, p. 105-114, jan/jun, 2007.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. **Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios**. 2010. <Disponível em: <http://cultivandotalentos.tempsite.ws/2010/10/impacto-da-qualidade-da-materia-prima-na-industria-de-laticinios>> Acesso em 04/05/2011.

CENTER FOR DISEASES CONTROL (US). 2009. **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/briefing/fncidod/eid/voln05/mead.htm>>. Acesso em: 09/10/2010.

COSTA, G. M.; PAIVA, L. V.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, D.; PEREIRA, U. P.; SILVA, N. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulasepositive *Staphylococcus* isolated from bovine mastites. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 403-406, 2010.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; MONTI-BRAGADIN, C. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic sequences. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 119, p. 167-174, 1994.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 16-34, 2000.

DINGWELL R.T.; LESLIE, K.E.; SCHUKKEN, Y.H.; SARGEANT, J.M.; TIMMS, L.L.; DUFFIELD, T.F.; KEEFE, G.P.; KELTON D.F; LISSEMORE, K.D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at dryvng-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75-89, 2004.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 1090-1096, 2004.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

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

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar: Doenças de origem alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 2002, p.65-108.

FEITOSA, T. Pesquisa de *Salmonella* spp, *Listeria* spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, dez, 2003.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, jul/ago, 2004.

FREITAS, M. F. L.; BALBINO, T. C. L.; MOTA, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Exotoxinas estafilocócicas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, Pernambuco, v. 7, n. 2 e 3, p. 63-74, maio/dezembro, 2004.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* sp. isolados de queijo Minas Frescal**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FERREIRA, L. M.; CONDE, S. O.; ZAFALON, L. F.; MELO, P. C.; SOUZA, V.; SVIECH, S.; NADER, A. F. Identificação de genes enterotoxigênicos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. In: III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008, Recife. **Anais...** Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008.

FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; DUARTE, D. A. M.; VASCONCELOS, A. M. M.; RIBEIRO, A. R.; MOTA, R. A.; BALBINO, T. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. Isoladas de queijo de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 375-379, abr./jun, 2009.

FISCHER, A.; FRANCOIS, P.; HOLTFRETER, S.; BROEKER, B.; SCHRENZEL, J. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, p. 184-190, 2009.

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**, v. 41, p. 376-380, 2010.

GILLIGAN, K.; SHIPLEY, M.; STILES, B.; HADFIELD, T.L.; IBRAHIM, M.S. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 71-78, 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos: Agentes bacterianos de toxinfecções**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p. 215-276.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T., WILLIAN, S. T. **Gram-positive cocci**. In: BERBEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994, p. 544-551.

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction, **Food Microbiology**, v. 25, p. 452–459, 2008.

INPPAZ/OPS/OMS. Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis/Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Epidemiológica. **Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]**. 2006. <Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>> Acesso em: 14/09/2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisas Trimestrais do Abate de Animais, do Leite, do Couro e da Produção de Ovos de Galinha**. 2011. <Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201101_publ_completa.pdf> Acesso em 04/05/2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2009. <Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/default_pdf.shtm> Acesso em 23/02/2011.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

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

JOHNSON, S.; KRÜGER, D.; LABISCHINSKI, H. FemA of *Staphylococcus aureus*: Isolation and immunodetection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 221-228, 1995.

JAY, J. M. Staphylococcal Gastroenteritis. **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg Maryland: 2000. p.441-459.

KOKAN, N. P.; BERGDOLL, M. S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2675-2676, 1987.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991, 1500 p.

KONEMAN, E. W. Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. In: KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed.. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 551- 588.

KIM, C. H.; KHAN, M.; MORIN, D. E.; HURLEY, W. L. ; TRIPATHY, D. N.; KEHRLI JR, M.; OLUOCH. A. O.; KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 74-83, 2001.

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

LUZ, I. S. Molecular characterization of toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and "coalho" cheese in cities from the Agreste region of Pernambuco. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 3, Jun. 2009.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, jan. 2011.

MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

MONSALLIER, G. Les mammites: stratégie thérapeutique dans les grands élevages. **Les entretiens de Bourgelat**, p.53-62, 1986.

MATHIEU, A.M., ISIGIDI, B.K., DEVRIESE, L.A., GODARD, C., VAN HOOFF, R. Characterization of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. strains isolated from bovine meat in Zaire. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, p. 119-126, 1991.

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v. 59, n. 2/3, p. 139-145, Jan. 1998.

MCLAUGHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.

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

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

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, 124, 66–72, 2007.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M. H.; ACOSTA, E. M. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento intensivo. **Revista Científica da FMC**, v. 2, n. 2, p. 02-633, 2007.

MILKNET. **MA: Laticínios vão Investir R\$ 4 milhões em 2010.** 2009. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br/?pg=noticias&id=11058&buscador>> Acesso em 12/11/2010.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** - Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, v.1, n. 1, 28 p., dez., 2001.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. de La. Development of two multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food protection**, v.66, n.6, p. 1055-1062, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **TaxBrowser**, Washington, 12 dez. 2006. <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>> Acesso em: 06/09/2009.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1316-1318, 2007.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, Dong-Liang; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, May 2005.

OLIVEIRA, K. A.; EVÊNCIO NETO, J.; Paiva, J. E.; MELO, L.E.H. Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 435-440, jul./set., 2010.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. **Toxins**, v. 2, p. 2117-2131, 2010.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. J.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M.. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**. v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PRATTEN, J.; FOSTER, S. J.; CHAN, P. F.; WILSON, M.; NAIR, S. P. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 633-637, 2001.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21:171-175, 2001.

PEREIRA, G. I. Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina a inoculado em queijo prato. 2006. 85p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus Aureus* and Multiplex PCR Detection of Classic Enterotoxin Genes in Cheese and Meat Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 145-148, 2009.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177-2197, 2010.

PONTES, A. **País planeja liderar exportação de produtos lácteos em cinco anos. Diário do Comércio & Indústria**. 2010. Disponível em <<http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=107306>>. Acesso em 15/01/2011.

RUZIN A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPI1- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 41, p. 365-377, 2001.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD D. C.; GAY, C. C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737 p.

RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R.; Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p.825-829, 2005

RŮŽIČKOVÁ, V.; KARPÍŠKOVÁ, R.; PANTŮČEK, R.; POSPÍŠILOVÁ, M.; ČERNÍKOVÁ, P.; DOŠKAŘ, J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 60–65, 2008.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR, A.; CANDEIAS, J. M. G.; Cardoso, K. F. G.; ARAÚJO JR, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized Milk. **Veterinary Microbiology**. 132, 408–413, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras em placas. In: **Manual de Métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. Cap. 3, p. 21-29.

SILVA, W. P. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite. 1998. 88 p. **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SPADOTI, L. M.; OLIVEIRA, A. J. Uso de leite reconstituído na fabricação de queijo mussarela. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, Jan. 1999.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1347-1353, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2 ed, 2001.

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

SOMMERHÄUSER, J., KLOPPERT, B., WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K.; The apidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 91-102, 2003.

SCHERRER D., CORTI S., MUEHLHERR J.E., ZWEIFEL C., STEPHAN R. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 101–107, 2004.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 41-45, 2006.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1565-1568, 2006.

SRINIVASAN, V.; SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. J.; CEASARIS, L.; OLIVER, S. P. Prevalence of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk of Cows with Mastitis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 3, 2006.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 1-22, 2007.

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, 2010a.

SANTANA, E. H. W.; CUNHA, M. L. R. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; BELOTI, V. Assessment of the Risk of Raw Milk Consumption Related to Staphylococcal Food Poisoning. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 643-652, jul./set. 2010b.

SEBRAE. Bovinocultura Leitaria. **Boletim Setorial do Agronegócio**. Recife, agosto, 2010.

TRANTER, H. S. Foodborne staphylococcal illness: **food borne illness**. **Lancet**, London, v. 27, n. 8722, p. 1044-1046, Oct. 1990.

TSEN, H. Y.; CHEN, T. R. Use of polymerase chain reaction for detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 88-91, 1992.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: **Microbiologia**. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

VAN BELKUM, A.; KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. **Journal of Microbiological Methods**, v. 48, p. 19-42, 2002.

VERAS J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALI, C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**. v. 17, n. 104-105, p. 218, 2003.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZSCHÖK, M.; BOTZLER, D.; BLOCHER, S.; SOMMERHAK, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 569-574, 2000.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; VESCHI, J. L. A. *Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados de amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2009.

ZOCHE, F.; FRANCA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 34, n. 7, p. 487-491, jul. 2009.

YANG, Y.; SU, Xu-dong; YUAN, Yao-wul; KANG, Chun-yu¹; LI, Ymg-jun; ZHANG, W.; ZHONG, X. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain Reaction Assay. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 7, p. 857-862, 2007.