

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

RAQUEL DE OLIVEIRA LO TURCO

**QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO GENE COA
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A PARTIR DE QUEIJOS E
EMBUTIDOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2013

RAQUEL DE OLIVEIRA LO TURCO

**QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO GENE COA
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A PARTIR DE QUEIJOS E
EMBUTIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. LUCIANA FURLANETO-MAIA

LONDRINA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO GENE COA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A PARTIR DE QUEIJOS E EMBUTIDOS

RAQUEL DE OLIVEIRA LO TURCO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado no mês de Setembro de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Profa. Orientadora

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Membro titular

Profa. Dra. Caroline Maria Calliari
Membro titular

RESUMO

LO TURCO, Raquel O. **Quantificação e identificação genotípica do gene COA de *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos** 2013. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

Dentre os diversos tipos de micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados e carne suína, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares nos alimentos contaminados. *S. aureus* são cocos gram-positivos, vistos ao microscópio na disposição de cachos de uva ou aos pares, mesófilos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. As enterotoxinas estafilocócicas apresentam elevada resistência térmica, incluindo tratamentos térmicos aplicados em alimentos, como a pasteurização. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase é baseada na amplificação do DNA e tem-se mostrado bastante útil para identificação da origem do *S. aureus* em alimentos diferenciando as cepas provenientes de infecções humanas e animais, porque é tida como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória. Populações de *S. aureus* tem mostrado considerável variabilidade no conteúdo genômico. Esta variabilidade contribui para a emergência de distintos perfis epidemiológicos que são dependentes das cepas/isolados, o que sugere a necessidade de identificar esses subtipos antes de aplicar medidas específicas para controle desta bactéria. O objetivo deste trabalho foi quantificar e identificar genotipicamente *Staphylococcus aureus* em amostras de queijos e embutidos. A técnica que utilizada, conhecida por PCR, recria grande quantidade de um gene a partir de uma parte ínfima de DNA. Demonstra vantagens como diminuição do período laboratorial, redução do número de reagentes, entre outras. Com este estudo verificou-se a presença de *Staphylococcus* sp em 100% das amostras de embutido e 75% das amostras de queijo. Contudo, pela aplicação da técnica de PCR, obtivemos como resultado uma controvérsia em relação às colônias que apresentaram-se positivas para o teste da coagulase e a presença do gene *coa*, demonstrando assim que o teste bioquímico não é totalmente preciso.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. PRC. Patogenicidade. Queijo Minas Frescal. Embutidos.

ABSTRACT

LO TURCO, Raquel O. **Measurement and genotypic identification of coa's gene staphylococcus aureus from cheese and embedded** 2013. 34p. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2013.

Among the various types of pathogenic microorganisms that can be transmitted through milk and dairy products and pork, there are *Staphylococcus aureus*, whose importance in the epidemiology of foodborne diseases stems from its high prevalence and the risk of production of toxins in contaminated food that cause gastroenteritis food. *S. aureus* are gram-positive cocci, seen under the microscope in the disposition of grape clusters or in pairs, mesophilic, aerobic or facultative anaerobes. Staphylococcal enterotoxins have high thermal resistance and can survive heat treatments applied in foods, such as pasteurization. The technique of Polymerase Chain Reaction amplification is based on DNA and has been shown to be useful for identifying the source *S. aureus* in food differentiating strains from human and animal infections, because it is seen as a technique extremely reliable, reproducible, rapid and highly discriminatory. *S. aureus*' population has shown considerable variability in genomic content. This variability contributes to the emergence of different epidemiological profiles that are dependent strains / isolates, suggesting the need to identify these subtypes before applying specific measures to control this bacteria. The aim of this work was to isolate *Staphylococcus aureus* in cheese and sausages. The technique used, known by PCR recreates large amount of a gene from a tiny fraction of DNA. Demonstrates advantages such as reduced time laboratory reducing the number of reagents, among others. This study verified the presence of *Staphylococcus* sp 100% of embedded samples and 75% of the samples of cheese. However, the application of PCR, obtained as a result of a dispute regarding ace colonies that were positive for coagulase test and the presence of the coa gene, thus demonstrating that the biochemical test is not completely accurate.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. PRC. Pathogenicity. Minas cheese. Embedded.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Em1: teste catalase positiva (A) e negativa (B); em2: teste coagulase negativa (C) e positiva (D), característicos de <i>S. aureus</i>	21
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de Sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> isoladas de queijos e embutidos.....	24
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> presente nas amostras de embutidos e queijo minas frescal	20
Quadro 2 – Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>S. aureus</i> a partir de alimento, frente aos antibióticos de uso clínico	26

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 – Colônias características de <i>S. aureus</i> em Ágar Baird Parker.....	21
Fotografia 2 – Gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio.....	22
Fotografia 3 – Foto do gel de agarose com os amplicons para identificação do gene <i>coa</i>	22
Fotografia 4 – Colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> inoculadas em agar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	9
3.1.1 Contaminação por <i>S. aureus</i> em leite e queijo	12
3.1.2 Contaminação por <i>S. aureus</i> em embutidos	13
3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	15
4 METODOLOGIA	17
4.1 MATERIAL EM ESTUDO	17
4.2 MÉTODOS	17
4.2.1 Isolamento de <i>S. aureus</i>	17
4.2.2 Teste de difusão em discos	18
4.2.3 Extração de DNA de <i>Staphylococcus sp</i>	18
4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos de micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados e carne suína, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares.

A qualidade do leite assume destacada importância também sob o ponto de vista de Saúde Pública. No Brasil, embora não existam estatísticas disponíveis sobre o assunto, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos. Contribui para isto, entre outras causas, o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser proveniente do mercado informal.

Como qualquer produto de origem animal, a carne suína pode servir de substrato para o desenvolvimento de vários micro-organismos e vermes, como também vetor de intoxicações químicas, por resíduos de defensivos, de hormônios e aditivos intencionais. Todas as etapas do abate devem ser realizadas de forma higiênica e rápida, pois determinam a qualidade microbiológica da matéria prima.

S. aureus são cocos gram-positivos, vistos ao microscópio na disposição de cachos de uva ou aos pares, são mesófilos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. As enterotoxinas estafilocócicas apresentam elevada resistência térmica, podendo sobreviver a tratamentos térmicos aplicados em alimentos, como a pasteurização.

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase é baseada na amplificação do DNA e tem-se mostrado bastante útil para identificação da origem do *S. aureus* em alimentos diferenciando as cepas provenientes de infecções humanas e animais, por ser uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória. Populações de *S. aureus* tem mostrado considerável variabilidade no conteúdo genômico. Esta variabilidade contribui para a emergência de distintos perfis epidemiológicos que são dependentes das cepas/isolados, o que sugere a necessidade de identificar esses subtipos antes de aplicar medidas específicas para controle desta bactéria.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos e verificar a variação do gene *coa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e quantificar *S. aureus* em amostras de queijo tipo minas frescal e embutidos;

Identificar o gênero e a espécie pelas técnicas fenotípicas;

Verificar o padrão de amplificação do gene *coa*;

Determinar a resistência a antibióticos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dentre os diversos tipos de micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONIA & PICCININI, 1999).

S. aureus são bactérias de forma esféricas gram-positivas, dispostas aos pares ou em cachos no exame microscópico, são aeróbios ou anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é de 37°C. É classificado como micro-organismo mesófilo, porém pode apresentar crescimento em temperaturas de 7,0 a 47,8°C (JAY, 1994). As enterotoxinas estafilocócicas, por outro lado, são produzidas entre 10 e 46°C, (SMITH et al., 1983) e apresentam elevada resistência térmica incluindo tratamentos térmicos aplicados em alimentos, como a pasteurização. Esta bactéria é capaz de se multiplicar na faixa de pH entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6 a 7 e apresentam tolerância a concentrações de 10 a 20 % de NaCl e a nitratos. Ainda, tem a capacidade de crescer em valores de atividade de água (Aa) de 0,86 (JAY, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 2005).

O gênero *Staphylococcus* possui 35 espécies e 17 subespécies, dentre elas, as espécies coagulase positivas apresentam maior importância clínica devido aos seus fatores de patogenicidade. *S. aureus* no indivíduo sadio é considerado um micro-organismo comensal das narinas anteriores, pele úmida, boca e intestino. Porém, estes micro-organismos apresentam propriedades que lhes permitem uma rápida colonização e posterior invasão através de pequenas lesões na pele e mucosas, sendo que nas mastites as mãos dos ordenhadores são consideradas como principais vias de transmissão (LU et al., 2005)

S. aureus possui vários fatores de virulência que contribuem para a sua persistência nos tecidos animais, como produção de toxinas extracelulares e enzimas (SANTOS et al., 2003). De acordo com Hamill et al. (1986) os *Staphylococcus* sp aderem às células endoteliais por meio de receptores de

adesinas e são fagocitados por essas. O ambiente intracelular protege os *Staphylococcus* sp dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos dos antibióticos. Segundo Lee *et al.* 2004, estes fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente.

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem, em média, cerca de 4 horas após ingestão do alimento contaminado, podendo variar de 1 a 6 horas. Os principais sintomas são náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia, sudorese, dor de cabeça e, algumas vezes, diminuição da temperatura corporal. Geralmente duram entre 24 e 48 horas e o índice de mortalidade é muito baixo (JAY, 1992; FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Espécies de *S. aureus* isolados de alimentos também apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença (FREITAS *et al.*, 2005). Martins *et al.* (1998) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso frequente e indiscriminado de antibióticos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os micro-organismos. O surgimento de *S. aureus* multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES, OLIVEIRA, 2004).

Nunes (2000) afirma que os micro-organismos resistentes não são um problema restrito ao ambiente hospitalar e que esses micro-organismos estão disseminados também em qualquer ambiente.

Além das enterotoxinas, algumas enzimas são produzidas, como fatores de virulência, por determinadas espécies de estafilococos e são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação deste gênero microbiano ou de suas espécies. Entre estas enzimas, destacam-se a catalase, a termonuclease e a coagulase. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A proteína coagulase é um importante fator de virulência de *S. aureus*, pois é capaz de promover a coagulação do plasma sanguíneo (GHARIB, *et al.* 2013).

Populações de *S. aureus* tem mostrado considerável variabilidade no conteúdo genômico. Esta variabilidade contribui para a emergência de distintos perfis epidemiológicos que são dependentes das cepas/isolados, o que sugere a

necessidade de identificar esses subtipos antes de aplicar medidas específicas para controle desta bactéria (FITZGERALD, et al. 2003; ZECCONI e PICCININI, 1999). Nos últimos anos, várias técnicas de biologia molecular têm sido utilizados para identificar e comparar os subtipos de *S. aureus*. A amplificação do gene de coagulase (*coa*) tem sido considerada como um método simples e preciso para tipagem de *S. aureus* isolados a partir de fontes distintas. Os resultados da investigação epidemiológica com base na análise do gene *coa* sugerem que alguns subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação alimentar (SU, et al. 1999; SCHLEGELOVÁ, et al. 2003).

Em relação a alimentos, o grupo dos estafilococos coagulase positiva (capazes de produzir a enzima coagulase) são os mais importantes em relação as demais espécies do gênero, pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença em alimentos processados pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo; segundo, porque suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar. Sabe-se que a prova bioquímica convencional não detecta precisamente a produção de coagulase, pois a proteína pode não estar sendo expressa. Neste sentido, técnicas moleculares para a detecção do gene *coa* tem sido de fundamental importância na confirmação de *S. aureus* em alimentos (VIEIRA DA MOTTA et al. 2001).

S. aureus, *S. hyicus* e *S. intermedius* são capazes de produzir enterotoxinas, bem como de produzir coagulase. Diversos trabalhos sugerem a utilização da PCR como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados. Para *S. aureus* já foram utilizados, entre outros, o gene *coa* (que codifica a produção da coagulase), entretanto, para as demais espécies de estafilococos coagulase positiva, poucos estudos moleculares foram realizados até o momento (AHLAM et al., 2013).

3.1.1 Contaminação por *S. aureus* em leite e queijo

O leite é um meio de cultura ideal para os micro-organismos em geral, por apresentar uma composição quase perfeita como alimento. Assim, a multiplicação dos micro-organismos é muito rápida, se a temperatura for ideal para o crescimento (COUSINS & BRAMLEY, 1987). A contaminação microbiana do leite pode ocorrer por duas vias principais: através da incorporação de micro-organismos que estão presentes no úbere, diretamente para o leite; ou através do contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha ou da coleta e armazenamento (FEHLHABER & JANESTSCHKE, 1995).

A contaminação do leite com *S. aureus* pode ocorrer através das duas vias, uma vez que se trata de um micro-organismo patogênico que pode causar inflamações no úbere das vacas, além de estar presente em superfícies de utensílios e equipamentos de ordenha (FONSECA & SANTOS, 2000). Neste último caso, deve-se ressaltar a importância do homem como reservatório de *S. aureus* e principal veiculador do micro-organismo em alimentos, de modo geral (JAY, 1994).

S. aureus está amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros, sendo que a probabilidade de contaminação do leite cru com a consequente produção de enterotoxinas é bastante elevada. Em bovinos, KENNY et al. (1993) relataram que no mínimo 28,6% das cepas isoladas do úbere secretam uma ou mais toxinas e MATSUNAGA et al. (1993) encontraram 34,5% de cepas enterotoxigênicas. Em cabras, a ocorrência é ainda maior, a julgar pelos dados apresentados por VALLE et al. (1990), os quais obtiveram 48,8% de cepas toxigênicas de *S. aureus* isoladas diretamente do leite.

A qualidade do leite assume destacada importância também sob o ponto de vista de Saúde Pública. No Brasil, embora não existam estatísticas disponíveis sobre o assunto, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos. Contribui para isto, entre outras causas, o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser proveniente do mercado informal (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999), ou seja, comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial.

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos

assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA *et al.*, 2003).

O queijo Minas tem sido o objetivo de estudo de vários pesquisadores em diferentes regiões do país. Os diferentes estudos buscam avaliar as características físico-químicas e as condições microbiológicas deste produto, avaliando também a metodologia para enumeração de micro-organismos e dos melhores meios de cultura para isolamento destes micro-organismos. O interesse por este produto se deve ao fato de que o queijo Minas está relacionado a doenças de origem alimentar.

A contaminação pós-pasteurização, produção, manipulação, equipamentos, temperaturas inadequadas durante o transporte e condições de estocagem podem resultar em altos níveis de micro-organismos patogênicos e enterotoxinas no queijo (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles, elaborados a partir de leite cru no Brasil, a comercialização de queijo tipo minas "frescal" produzido artesanalmente tem sido realizada abertamente em nosso meio (ALMEIDA FILHO, 1999).

3.1.2 Contaminação por *S. aureus* em embutidos

Embutidos crus curados são produtos nos quais ocorre uma fermentação microbiana que leva ao acúmulo de ácido lático com a conseqüente queda do pH, fato favorável ao crescimento de bactérias patogênicas e reações bioquímicas que ocorrem durante o processo de maturação (PEREDA *et al.*, 2005). Os embutidos podem ser divididos de três maneiras: frescos ou crus, secos e cozidos. Os frescos ou cozidos são aqueles que devem ser consumidos em um período máximo de seis dias. Os secos são embutidos crus que passaram por um processo de desidratação. Os cozidos são os que sofreram processo de cozimento em estufa ou em água (ROÇA, 1981).

Antigamente, a produção era vista mais como uma arte do que realmente uma ciência. Porém, com a importância econômica e crescimento da sua

industrialização tornou-se necessário um maior entendimento dos princípios envolvidos na elaboração desses produtos (OLIVO, 2006).

No Brasil, os embutidos crus produzidos a partir de carnes bovina, suína e de aves ainda carecem de padrões de identidade, com grande heterogeneidade na qualidade do produto final no que se refere à apresentação do produto, composição e valor nutricional (FERRÃO, 1999).

A linguiça do tipo frescal apresenta, como características físico-químicas, umidade máxima de 70%, gordura máxima de 30% e proteína mínima de 12% (BRASIL, 2003). O processo requer adição de sais de cura, recurso que permite ao alimento alcançar as características de qualidade sensorial desejada – sabor, cor, aroma e textura e a preservação do produto (TAKAHASHI, 1993).

A qualidade de um alimento é definida a partir de um conjunto de características, dentre essas existem as relacionadas a aspectos nutricionais e sanitários. Essas características são fundamentais para a determinação da qualidade de alimentos, principalmente aquelas processadas artesanalmente, uma vez que possuem uma maior vulnerabilidade a contaminações devido às condições higiênico- sanitárias, muitas vezes precárias. Atualmente, a qualidade da carne representa uma das principais preocupações, especialmente para consumidores mais exigentes (MILLEZI, et al, 2007).

Os micro-organismos podem contaminar os alimentos por inúmeras vias, sempre refletindo condições precárias de produção, armazenamento, distribuição ou manuseio doméstico. De modo geral, pode-se dizer que a qualidade da carne e da carcaça depende da interação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos mais importantes são a genética, o manejo alimentar, a idade e o sexo. Entre os fatores extrínsecos, são muito importantes as condições de abate, desde a saída dos animais da propriedade até a entrada das carcaças nas câmaras frias, o tipo de cozimento e os métodos de conservação (NORMANNO et al. 2005).

Como qualquer produto de origem animal, a carne suína pode servir de substrato para o desenvolvimento de vários micro-organismos e vermes, como também condutor de intoxicações químicas, tipos resíduos de defensivos, de hormônios e aditivos intencionais. Todas as etapas do abate devem ser realizadas de forma higiênica e rápida, pois determinam a qualidade microbiológica da matéria prima.

Um importante agente de contaminação dos alimentos é o manipulador, pois na pele pode existir uma microbiota potencialmente patogênica. A maioria dos casos de toxinfecções alimentares ocorre através de manipuladores, que comprometem os alimentos por hábitos ou práticas inadequadas de higiene. Dentre os principais patógenos veiculados por indivíduos doentes ou portadores esta o *Staphylococcus aureus* (HALPING – DOHNALEK & MARTH, 1989). É essencial que haja adoção das boas práticas na indústria de alimentos, para a obtenção de produtos com qualidade, livre de contaminação (SANTOS, 1996).

S. aureus é o principal micro-organismo relatado em casos de surtos de intoxicação alimentar. Suas enterotoxinas são produzidas por cerca de 1/3 das cepas coagulase positivas envolvidas nesta contaminação (HALPING – DOHNALEK & MARTH, 1989).

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Em 1985, Kary Mullis inventou a PCR - POLYMERASE CHAIN REACTION, em português Reação em Cadeia da Polimerase, técnica que permite recriar grande quantidade de um gene a partir de uma parte ínfima de DNA. (WERB, 1999). Esta técnica impulsionou drasticamente o ritmo da pesquisa genética. Em questão de algumas horas, PCR pode fazer bilhões de cópias de um segmento específico do DNA. Kary Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993 por inventar a PCR.

A técnica baseada na amplificação do DNA é tida como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (VERSALOVICK, 1994). Esta técnica faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservados com sequencias repetitivas de DNA e presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias Gram negativas e em muitas bactérias Gram positivas (LUPSKI, 1992).

Com relação à identificação da origem do *S. aureus* no leite de consumo, diversos métodos bioquímicos e moleculares têm sido utilizados para diferenciar as cepas provenientes de infecções humanas e animais. A técnica de PCR tem-se mostrado bastante útil para esta finalidade, devido à sensibilidade e rapidez,

possibilitando o monitoramento de cepas e o estudo taxonômico molecular (PEREIRA et al., 2002).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL EM ESTUDO

Foram analisadas neste estudo 12 (doze) amostras de embutidos (linguiça frescal) e 16 (dezesesseis) amostras de queijo tipo minas frescal, adquiridas aleatoriamente na forma de consumidor em diferentes pontos de vendas localizados em feiras livres no município de Londrina – PR. As amostras foram transportadas em sua própria embalagem à temperatura ambiente até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Londrina, foram higienizadas com álcool 70% para evitar contaminação cruzada.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento de *S. aureus*

Para o isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp, seguiu-se com plaqueamento em ágar seletivo e diferencial Baird Parker adicionado de gema de ovo com telurito. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias características foram cultivadas em ágar BHI (brain heart infusion) por 24 horas a 37°C.

As colônias isoladas em Agar BHI foram identificadas por meio da coloração diferencial de Gram e produção de catalase, que foi realizada em lâmina, adicionando a uma colônia, 0,2mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 3%. Foram considerados como *Staphylococcus* sp, os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos e produção da enzima catalase.

A partir disso, foram realizados testes bioquímicos de identificação como teste de DNase e teste de coagulase. Para o teste de DNase, colônias foram semeadas

em placas contendo ágar DNase e incubadas a 37°C. Após este período foi observado a formação de um halo esbranquiçado ao redor da colônia. Já o teste de coagulase foi realizado transferindo 0,2mL de cada cultura obtida em caldo BHI para membrana de microscopia e adicionado 0,5mL de plasma de coelho. Após homogeneização lenta, a mistura foi incubada a 37°C e a formação de coágulo foi verificado após 4 horas.

Para a confirmação da espécie *S. aureus*, colônias foram inoculadas em Agar manitol salgado e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias características da espécie apresentam um halo amarelo devido à fermentação do manitol.

4.2.2 Teste de difusão em discos

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos à avaliação frente a antimicrobianos, utilizando protocolo recomendado pelo NCCLS (2000). Três a cinco colônias puras recentes (18 a 24 horas) dos espécimes previamente isolados e identificados foram semeados em caldo Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37°C até que atingisse turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Estes espécimes foram semeados com auxílio de suabes na superfície de ágar MH e, após absorção, adicionados os discos dos antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e os diâmetros de inibição foram medidos e avaliados em tabela de sensibilidade.

4.2.3 Extração de DNA de *Staphylococcus sp*

Os DNAs genômicos dos isolados foram extraídos utilizando-se a técnica da lise térmica realizada de acordo com o protocolo descrito por Zocche *et al*, 2009. Com auxílio de uma alça transferiu-se uma colônia para caldo BHI seguido de incubação a 37°C por 24h. Dois mililitros da cultura foi transferido para tubo *Eppendorf* e centrifugada a 10.000rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com água destilada estéril a 10.000xg por 10 minutos. A lise

celular ocorreu pela adição de 100µL de Tampão de lise celular Tris-EDTA (50mM Tris base e 20mM de EDTA, pH 7,8) contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 3µL de proteinase K (20mg.mL⁻¹), e incubado em banho-maria a 37°C por 1h. Em seguida adicionado 200µL de solução NaCl 5M e agitado manualmente por 15seg.

Houve separação do material intracelular através de centrifugação a 10.000xg por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A precipitação do DNA se realizou com 800µL de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por 24h. Uma nova centrifugação foi feita a 10.000xg por 15min, e o pellet ressuscitado com 30 µL de água ultrapura estéril. Os tubos contendo o DNA genômico foram utilizados na reação de amplificação por PCR.

4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Colônias aleatórias, suspeitas de *S. Aureus* foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gene *Coa* (cagulase). A região 3'-terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando os *primers* específicos: COAG2 (ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e COAG3 (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3') descritos por Aarestrup et al. (1995).

Para a reação com 25 µl foram utilizados como reagentes: 12,1 µl de água Milli Q estéril, 2,5 µl de Tampão 10X, 0,4 µl de Taq polimerase 5U/L, 1,5 µl de dNTP 200 µM, 1,5 µl de Cloreto de Magnésio, 1,5 µl de cada primer a 50 pmol, e 3,0 µl de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (Biocycler) com a seguinte ciclagem: 95° C por 10 minutos, 30 ciclos de: 95° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto, e por fim, 72° C por 10 minutos.

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultra-violeta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

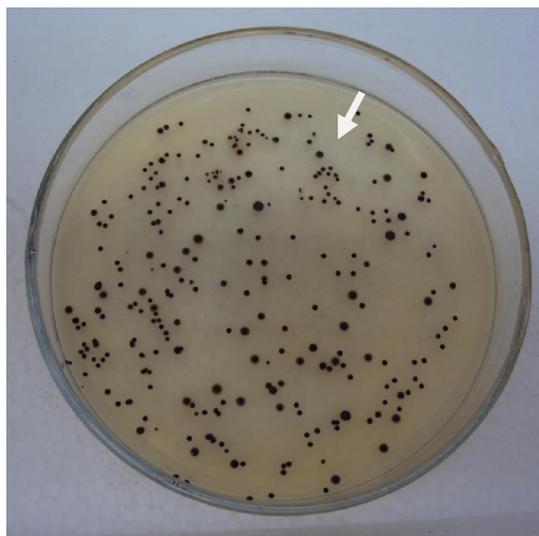
De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, 100% dos isolados obtidos neste estudo foram identificados como *S. aureus*. As contagens revelaram valores médios de $1,2 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^7$ UFC/g para embutidos e queijos, respectivamente (Quadro 1). A fotografia 1 apresenta o meio de cultivo BP com as colônias características de *S. aureus*.

AMOSTRA	UFC.g ⁻¹ mínimo	UFC.g ⁻¹ máximo	MÉDIA DE UFC.g ⁻¹
EMBUTIDO	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
QUEIJO	$1,07 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$

Quadro 1. Quantificação de *S. aureus* presente nas amostras de embutidos e queijo minas frescal.

Tais achados parecem ser extremamente preocupantes, pois além de se situarem acima do limite máximo para ambas as amostras de 10^3 UFC/g estabelecido pelo Ministério da Saúde, estes valores mostraram-se muito próximos dos requeridos para a produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Na fotografia 1 observa-se colônias características de *S. aureus* em Ágar Baird Parker.



Fotografia 1. Colônias características de *S. aureus* em Ágar Baird Parker. Nota-se colônias negras com halos translúcidos ao seu redor (seta).

Fonte: Autoria própria

A figura 1 apresenta dois testes bioquímicos característicos para a identificação de *S. aureus*.

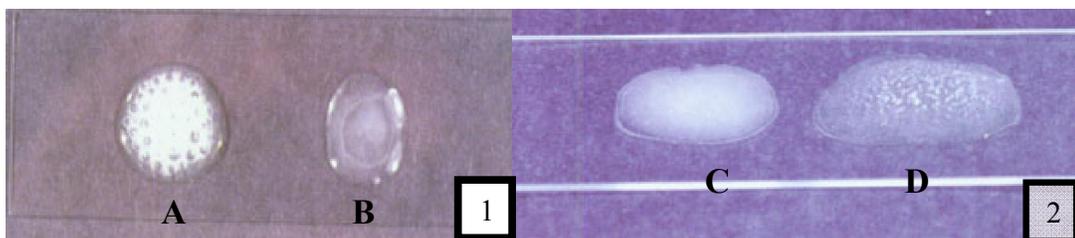
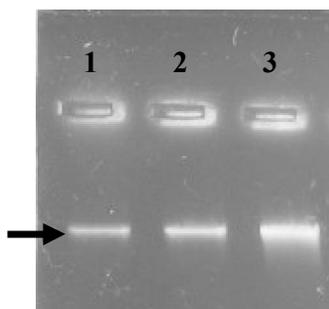


Figura 1. Em 1: teste catalase positiva (A) e negativa (B); em 2: teste coagulase negativa (C) e positiva (D), característicos de *S. aureus* (A) e (D)

Fonte: <http://faculty.mc3.edu/jearl/ML/ml-10.htm> - acessado em 16/08/2011

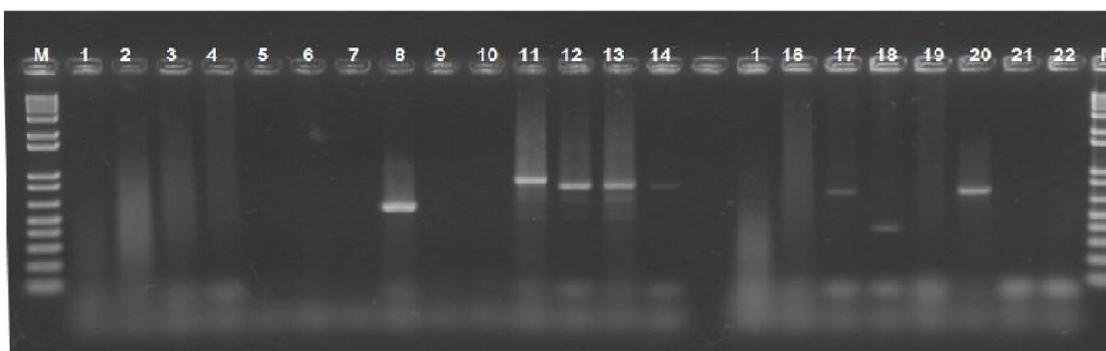
A fotografia 2 apresenta a quantificação e integridade do DNA genômico após a extração, em gel de eletroforese em agarose. Observa-se bandas integras e sem degradação que facilitou sua utilização na técnica da PCR.



Fotografia 2 – Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, representando 3 isolados de *S. aureus*; as canaletas 1, 2 e 3 mostram bandas nítidas de DNA genômico (seta).

Fonte: autoria própria

Para o teste de PCR, a fim de confirmar a espécie pela amplificação do gene *coa*, foram selecionadas 20 colônias que apresentaram os testes bioquímicos característicos para *S. aureus*. Contudo, nem todas apresentaram amplificação para o gene *coa*. Embora os testes bioquímicos de identificação apresentaram-se característicos para a espécie, a identificação pela PCR do gene para coagulase não corroborou com esses resultados (Fotografia 3). O teste fenotípico da coagulase apresenta algumas restrições em sua aplicação e a leitura dos resultados também dificultou a identificação da coagulação, a proteína pode ainda não estar sendo expressa nas condições de crescimento aplicadas neste trabalho.



Fotografia 3. Gel de agarose com os amplicons para identificação do gene *coa*. Canaletas M: marcador de peso molecular (1 KB DNA plus); canaletas 1 a 22 colônias oriundas de amostras de embutidos e queijo tipo minas frescal; canaletas 8, 11, 12, 13, 14, 17, 18 e 20 apresentam amplificação para o gene *coa*.

Fonte: autoria própria

Os *primers* coag2 e coag3 (mesma sequência utilizada nesta pesquisa) são específicos para este micro-organismo, pois não houve amplificação quando DNA de outras espécies em pesquisa realizada por GANDRA (2003). Este fato corrobora com os resultados obtidos neste trabalho e que apresentaram amplificação refere-se ao gênero *S. aureus*, podendo substituir a confirmação por testes bioquímicos. Os isolados que não apresentaram amplificação possivelmente não sejam estafilococos coagulase positiva, sendo que o teste de coagulase deu um falso positivo, ou se trata das demais espécies de estafilococos coagulase positiva (*S. hyicus* e *S. intermedius*). Como o gene *coa* apresenta polimorfismo entre as espécies de *S. aureus*, não há uma posição específica de bandas.

O número de pares de bases (pb) para gene *coa* variaram de 612 a 1000 pb. Esta variabilidade pode ser decorrente da variabilidade genética da enzima coagulase, demonstrada a existência de polimorfismo (GANDRA, 2003).

O perfil encontrado foi o mesmo demonstrado por Luz (2008), que detectou a presença de dois coagulotipos, de 750 pb e 1000 pb, em *S. aureus* isolados de leite e queijo coalho. Houve a distribuição e predominância dos coagulotipos de acordo com a região onde foram isolados (diferentes municípios).

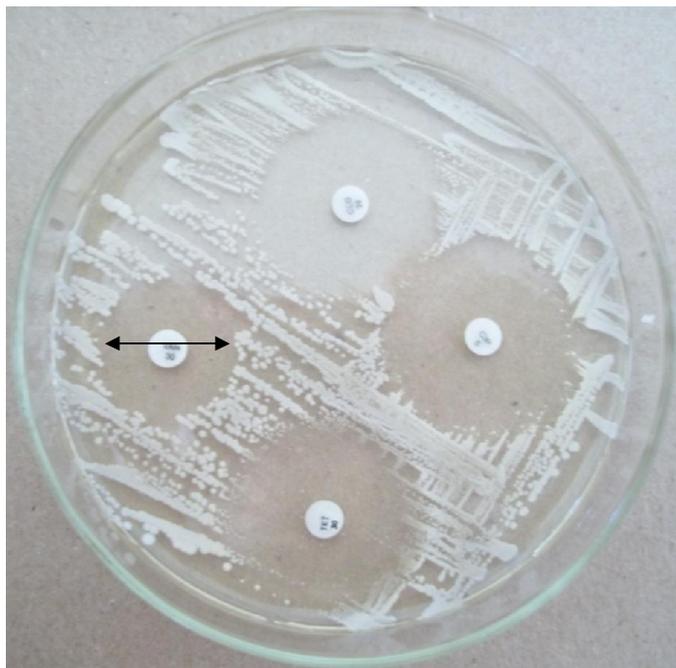
Ressalta-se que estafilococos produtores de enzimas coagulase e termonuclease geralmente estão relacionados com a produção de enterotoxinas (GANDRA, 2003), uma preocupação atual. Neste sentido, o diagnóstico molecular via PCR apresenta diversas vantagens em relação às técnicas da microbiologia clássica, sendo de fácil aprendizagem (simplicidade), menos tempo para adquirir as competências, menor custo de materiais, detecção de células viáveis não cultiváveis (VNC), maior especificidade, maior sensibilidade, bom limite de detecção e maior rapidez (FORSYTHE, 2002).

A padronização da amplificação da região do gene *coa*, codificador da produção de coagulase também foi realizada no estudo realizado por MATOS (2005), em função dessa prova ser utilizada na análise convencional para detectar *S. aureus*, espécie coagulase positiva.

Diversos são os antimicrobianos preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2009) para a realização do Teste de Disco Difusão para *S. aureus*. Para sua realização, existe a necessidade de protocolos, padronizações e,

particularmente, medidas do diâmetro de inibição. Neste estudo foram avaliados 12 antibióticos de uso clínico para *S. aureus*.

A fotografia 4 apresenta a formação de halos de inibição ao redor dos discos contendo antibiotico (método disco difusão Kirby-Bauer).



Fotografia 4. Colônia típica de *S. aureus* inoculada em ágar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos. Seta indica halo de inibição causada pelo antibiotico.

Os perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 21 cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas encontram-se na Tabela 1. O perfil de resistência em ordem decrescente ficou distribuído da seguinte forma: 76% das cepas foram resistentes à Penicilina, 42% à Tetraciclina, 38% à Eritromicina, 33% à Estreptomicina e Ácido Nalidíxico, 23% à Teicoplanina, Ciprofloxacina e Vancomicina, 19% à Norfloxacina, Gentamicina e Cloranfenicol e apenas 14% à Imipenem.

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)
TEICOPLANINA	23	77
NORFLOXACIN	19	81
PENICILINA	76	24
IMIPENEM	14	86
ESTREPTOMICINA	33	67
ERITROMICINA	38	62
GENTAMICINA	19	81
CLORANFENICOL	19	81
CIPROFLOXACIN	23	77
ÁCIDO NALIDÍXICO	33	67
VANCOMICINA	23	77
TETRACICLINA	42	58

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas queijos e embutidos

A maioria dos isolados de *S. aureus* foram susceptíveis ao IMIPENEM (76 %) e apenas três cepas (14%) dos isolados foram resistentes. Por outro lado os resultados do antibiótico penicilina demonstra ser o de menor eficiência contra o crescimento e evolução de cepas estafilocócicas. Dos isolados analisados 61% apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos, demonstrando assim serem multirresistentes (quadro 2).

Quadro 2 - Perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* a partir de alimento, frente aos antibióticos de uso clínico.

antibiótico/amostra	9E(13)	11E(4)	11E(9)	12E(1)	12E(2)	12E(5)	Q27(3)	15E(3)	Q29(6)	16E(12)	17E(2)	Q31(22)	FR02(2)	Q34(5)	Q35(1)	Q35(5)	Q36(8)	Q40(1)	Q40(14)	FR03(2)	FR03(10)
TEICOPLANINA	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
NORFLOXACIN	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PENICILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R
IMIPENEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
ESTREPTOMICINA	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
ERITROMICINA	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
GENTAMICINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
CLORANFENICOL	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
CIPROFLOXACIN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
ÁCIDO NALIDÍXICO	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
VANCOMICINA	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
TETRACICLINA	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R

R- resistencia; S - sensibilidade

Pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos, pudemos observar que *S. aureus* provenientes de amostras de alimento apresentaram resistência a diversos antibióticos, e salientamos que duas colônias obtidas de linguiça fresca apresentaram resistência a todos os antibióticos testados.

Segundo Sena (2000), a elevada resistência múltipla a antibióticos representa um risco potencial à saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis (SENA, M.J., 2000). Esse aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos também pode ser considerado como manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente. Como o tempo de duplicação das bactérias pode ser de apenas 20 minutos existe a possibilidade de serem produzidas muitas gerações em apenas algumas horas, havendo, portanto, inúmeras oportunidades de adaptação evolutiva (SILVEIRA et al., 2006).

Após décadas de tratamento das infecções estafilocócicas com antimicrobianos, observamos como consequência a emergência da resistência e desenvolvimento de novas drogas antibacterianas. Pesquisas envolvendo o perfil de resistência a antibióticos de *S. aureus*, isolados de portadores humanos e alimentos, comprovam que o uso indiscriminado desses agentes antimicrobianos representa problema crescente. O potencial patogênico desse micro-organismo está relacionado com sua grande capacidade de mutação para formas mais resistentes frente aos antibióticos mais largamente utilizados. O surgimento de cepas multi-resistentes aos antibióticos torna fundamental o desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana e reavaliações periódicas no perfil de susceptibilidade (PEREIRA, SIQUEIRA JÚNIOR e TAKAKI, 2004; MOURA et al., 2004).

Ainda, a ocorrência do uso de agentes antimicrobianos em rações animais tem sido um problema a décadas (COSTA et al., 2002). Na criação do gado leiteiro, a administração de antibióticos vem sendo feita principalmente, na profilaxia e tratamento de mastites, e ainda, incorporados à alimentação animal, como suplemento dietético e conservante de alimentos (PERESI et al., 2001). Isto faz com que apareçam micro-organismos resistentes, contribuindo para que estes produtos não sejam eficazes no tratamento do animal (COSTA et al., 2002).

O Queijo Minas frescal por ter um preço acessível e ser de fácil fabricação, é um produto amplamente consumido em diversas regiões do Brasil (SABIONI, et al., 1998). A pecuária de leite, associada à fabricação artesanal de queijos com venda

direta ao consumidor em feiras livres é comum em diversas regiões do país. Entretanto, na maioria das vezes estes produtos são elaborados a partir de leite sem qualquer tratamento térmico, com condições higiênico-sanitárias duvidosas, o que leva à produção de um derivado de qualidade inferior, senão potencialmente capaz de comprometer a saúde de seus consumidores (SILVA, 1998).

Os possíveis defeitos encontrados nestes produtos estão relacionados diretamente com a qualidade físico-química da matéria prima utilizada, bem como a má higiene do local onde está sendo fabricado o queijo, a manipulação inadequada e a permanência do produto, desde a produção até sua comercialização, em temperaturas que suportam o desenvolvimento de micro-organismos prejudiciais à saúde do homem, sendo, portanto um problema de Saúde Pública (BARROS, et al., 2004).

S. aureus é frequentemente pesquisado em alimentos, sendo o queijo, um dos principais veículos causadores de toxinfecção alimentar, pois sua presença está associada a práticas de higiene e manipulação inadequadas (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001). De acordo com a resolução –RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2011), o padrão microbiológico para *Staphylococcus* coagulase positiva é de no máximo 5×10^2 UFC/g, evidenciando que nenhuma das amostras estava dentro dos padrões.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados experimentais conclui-se que os alimentos analisados representam potencial risco à saúde humana. De um modo geral a elevada carga microbiana encontrada nos queijos e embutidos avaliados mostrou evidências de que pode ter ocorrido em algum momento do processamento do queijo, falhas como: contaminação oriunda dos manipuladores, tratamento térmico ineficiente, má qualidade da matéria-prima, contato do alimento com superfícies não sanitizadas, pasteurização ineficiente ou utilização de temperaturas impróprias para a conservação do produto.

Os problemas encontrados podem ser minimizados através de um controle regular de qualidade, análise dos pontos críticos e programas de educação sanitária, como a implantação ou melhoria de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Operacionais Padrão (POP's), tanto por parte dos produtores, como pelos órgãos competentes.

Em todas as amostras analisadas foram encontradas contagens fora dos padrões de segurança, confirmados em 70% das amostras de queijo e em 100% das amostras de embutidos por meio de testes tradicionais para identificação fenotípica e molecular.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO ES. **Características microbiológicas do queijo Minas "frescal", produzido artesanalmente e comercializado no Município de Poços de Caldas/MG.** [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal da UNESP; 1999.

ANUÁRIO MILKBIZZ. **Anuário Milkbizz** 1999/2000. São Paulo : Milkbizz, 1999. 326p.

ARAÚJO, F.D.S.; ESPER, L.M.R.; KUAYE, A.Y.; SIRCILI, M.P.; MARSAIOLI, A.J. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.585-592, 2012.

BARROS, P.C.O.G.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, E.M.; CHIAPPINI, C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.32-37, Julho, 2004.

BRASIL, ANVISA, **Resolução-RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001**, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol>. Acessado em 16/08/2011.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União. Set. 2003. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acessado em: 20/07/2013.

COUSINS, C.M.; BRAMLEY, A.J. Microbiologia de la leche cruda. In: ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactológica.** Zaragoza : Acribia, 1987. Cap.4, p.109-150.

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

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene veterinária de los alimentos.** Zaragoza : Acribia, 1995. 669p.

FEITOSA, F. L. F.; BORGES, A. S.; BENESI, F. J. et al. Concentração de imunoglobulinas G e M no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa até os 90 dias de idade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, sup. 1, p. 26-31, 2003.

FERRÃO, S.P.B.; SANTOS, W.L.M. & VERSIANI, C.v. Determinação de nitritos em lingüiças frescas comercializadas em Belo Horizonte – M.G. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, abril/maio 1999.

FITZGERALD, JR.; REID, SD.; RUOTSALAINEN, E.; et al. **Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins**. *Infect Immun* 2003;71:2827–2838;

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, Sao Paulo, v. 72, n.2, p.171-177, 2005.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo : Lemos Editorial, 2000. 175p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GHARIB, Ahlam A., ATTIA, Adel M.A.; BENDARY, M.M. **Detection of the Coa Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction**. *International Journal of Microbiological Research* 4 (1): 37-42, 2013.

HALPING – DOHNALEK, M. I.; MARTH, E.H.; *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. *J. Food Protct.*, 267-82, 1989.

HAMILL, R. J.; VANN, J.M.; PROCTOR R.A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: models for postadherence events in endovascular infections. **Infection Immunology**, v. 54, p. 833-836, 1986.

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

KENNY, K. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v.31, p.796-707, 1993.

LEE, J.H.; JEONG, J.M.; PARK, Y.H.; CHOI, S.S.; KIM, Y.H.; CHAE, J.S.; MOON, J.S.; PARK, H.; KIM, S.; EO, S.K. Evaluation of the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, South korea, v.42, n.6, p-2780-2782, 2004.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia do queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.31, n.6, 2001.

LU, P. et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC , v. 43, n. 1, p. 132-139, 2005.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**., v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MARTINS, S.C.S.;FELIX, P. R. ; NASCIMENTO, G. G. F. Isolamento e caracterizacao de bacterias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterapicos. **Higiene Alimentar**, Piracicaba, v.12, n.56, p.45-48, 1998.

MATSUNAGA, T. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J Vet Med Sci**, v.55, p.297-300, 1993.

MILLEZI, A.F.; TONIAL, T.M., ZANELLA, J. P., MOSCHEN, E.E.S.; DE ÁVILA, C. A. C.; KAISER, V.L.K.; HOFFMEISTER, S. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanificante na industria de alimentos. Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus de Frederico Westphalen, RS Revista Analytica, 28, 2007.

NORMANNO,G.; FIRINU,A.; VIRGILIO,S.; MULA,G.; DAMBROSIO,A.; POGGIU,A.; DECASTELLI,L.; MIONI,R.; SUCUOTA,S.; BOLZONI,G.; DIGIANNATALE,E.; SALINETTI, A.P.; LASALANDRA,G.; BARTOLI,M.; ZUCCON,F.; PIRINO,T.; SIAS,S.; PARISI,A.; QUAGLIA,N.C.; CELANO,G.V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. *Food Microbiol.* 2005. v. 98, p.73-79

NUNES, E.L.C. Detecção molecular do determinante genético da resistência a mupirocina em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina. Rio de Janeiro, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2000. 72p.

OLIVO, Rubison; MASSAMI, Shimokomaki. Emulsões Cárneas. In: **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p. 123-133.

OLSEN, J. E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, v. 3, p. 257-266, 2000.

PEREDA, J. A. O. *et. al.* **TENOLOGIA DE ALIMENTOS: Alimentos de Origem Animal**. Vol. 2. Editora Artmed. São Paulo. 2005.

PEREIRA, M.S.V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Lett Appl Microbiol**, v.35, p.32-36, 2002.

PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; TAKAKI, G.M.C. Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Peq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 1, p.11-14, 2004.

ROÇA, R.O., BONASSI, I.A. *Temas de tecnologia da carne e produtos derivados*. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônomicas. 1981. 129p.

SABIONI, G.J.; HIROOKA, Y. E.; SOUZA, R.L.M. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus* . **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, outubro 1998.

SANTOS, F. G. B., et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, Sao Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. ***Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype.** Vet Microbiol 92: 327–334, 2003.

SU, C.; HERBELIN, C.; FRIEZE, N.; SKARDOVA, O.; SORDILLO, LM. **Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas.** Epidemiol Infect p.122:329–336, 1999.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus sp.* isolado de queijos coalho comercializados em Recife/PE.** Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 75f. 2000.

SILVA, C.A.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: **Congresso brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos**, 17, 1998, Fortaleza. *Anais*. Fortaleza, 1998, p.134.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **J Food Protec**, v.46, p.545-555, 1983.

TAKAHASHI, G. Ingredientes e suas funções na fabricação de produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**. n. 199, ano XVII, p. 14-18. São Paulo, 1993

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.1323-1326, 1990.

VERSALOVICK, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Methods in Molecular and Cellular Biology, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIEIRA-DA-MOTTA, et al; Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Bras. J. Microbiol.**, v.32, n.1, p. 27-31, 2001.

WERB, Elton O futuro está nos genes - **Zero Hora**, Porto Alegre, 17 de outubro de 1999, Revista ZH p. 4-7

ZECCONI A, PICCININI R. Teoria e prática de controle de mastite por *Staphylococcus aureus*. Nappama 1999; 5:4–11.

ZOCHE, F. et al. Multiplex PCR for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin in south of Rio Grande do Sul, Brasil. Interciencia, vol. 34 n°7, 2009.