

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE  
ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DE  
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

**Maria Izabel Merino de Medeiros**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Setembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE  
ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DE  
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

**Maria Izabel Merino de Medeiros**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luis Manuel Medina Canalejo**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Setembro de 2011**

Medeiros, Maria Izabel Merino de  
M488e Epidemiologia molecular aplicada ao estudo de estirpes de  
*Staphylococcus aureus* na produção de Queijo Tipo Minas Frescal /  
Maria Izabel Merino de Medeiros. -- Jaboticabal, 2011  
viii, 70 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Antonio Nader Filho  
Co-Orientador: Luis Manuel Medina Canalejo  
Banca examinadora: Luciano Menezes Ferreira, Luiz Francisco  
Zafalon, Lisiane de Almeida Martins e Manoel Victor Franco Lemos  
Bibliografia

1. Enterotoxinas. 2. PCR. 3. PFGE. 4. Segurança Alimentar. 5.  
TSST-1. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 637.3:614.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS** – nascida na cidade de São Carlos – São Paulo, em 06 de Julho de 1972. Médica Veterinária, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília - UNIMAR no ano de 2000. Realizou estágio curricular na Embrapa CPPSE, onde acompanhou e executou atividades relacionadas a gado de corte e leite. Do ano de 2001 até 2003 trabalhou como Agente de Desenvolvimento do Programa SAI (Sistema Agroindustrial Integrado) parceria entre o SEBRAE e FEPAF – UNESP Botucatu. Ingressou em 2002 no curso de pós-graduação na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu – SP e obteve em janeiro de 2005 o título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Higiene Veterinária e Saúde Pública com a dissertação intitulada “Associação de Agentes Patogênicos Isolados em Análise Microbiológica da Água, com a Presença de Mastite Clínica ou Subclínica, em Vacas de Propriedades Leiteiras da Região de Cerqueira César – SP”. No ano de 2004 foi Coordenadora da Equipe SAI na cidade de Botucatu. Em 2005 assumiu o cargo público estadual como Pesquisadora Científica I na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA - Polo Centro Leste situado em Ribeirão Preto – SP, onde trabalhou com Qualidade do Leite, Sanidade Animal e Nutrição Animal. Em março de 2008, iniciou suas atividades no curso de Doutorado, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal – SP. No ano de 2010 nos meses de maio a outubro realizou o Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDEE - CAPES, na Universidade de Córdoba - UCO situada na cidade de Córdoba – Andaluzia – Espanha. Em 31 de maio de 2010 foi nomeada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV membro da Comissão Nacional de Saúde Ambiental – CNSA. Atualmente atua como Pesquisadora Científica Nível III no Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL situado na cidade de Campinas - São Paulo.

*“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”*

*Albert Einstein*

*“Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande, sólo es posible avanzar cuando se mira lejos”*

*José Ortega y Gasset*

## *Dedico*

*Aos meus pais,  
Alberto Antonio Ivo de Medeiros e Mercia Merino de Medeiros  
Pela educação, amor e apoio em todas as minhas escolhas.*

*À minha avó materna (in memoriam),  
Isabel Sanchez Cecília Gutierrez  
Por seus eternos ensinamentos e a herança de amor a Espanha que  
inspirou minhas escolhas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Antonio Nader Filho, pela orientação e principalmente pelo incentivo, apoio, confiança e grande amizade, ingredientes que possibilitaram meu crescimento profissional e a realização deste;

Ao Prof. Dr. Luis Manuel Medina Canalejo, pela co-orientação, apoio, amizade e início de uma grande parceria;

Aos Profs. Drs. Luciano Menezes Ferreira, Manoel Victor Franco Lemos, Oswaldo Durival Rossi Junior e Luiz Augusto do Amaral pela preciosa participação na composição da banca de Exame Geral de Qualificação;

Aos Profs. Drs. Luciano Menezes Ferreira, Luiz Francisco Zafalon, Lisiane de Almeida Martins e Manoel Victor Franco Lemos, pela participação na banca examinadora, e pelas valiosas sugestões para a conclusão do presente trabalho;

Aos demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pela amizade, agradável convívio e constantes ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ferraud, pela realização das análises estatísticas;

A FUNED - MG na pessoa do Dr. Ricardo Souza Dias pela detecção de enterotoxinas por imunodifusão;

Ao proprietário da micro-usina, por abrir suas portas, meus sinceros agradecimentos;

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, em especial Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibelli Jr (Diba), pelo carinho e atenção durante todos esses anos;

Às amigas Suzy Sviech dos Santos, Poliana de Castro Melo e Sandra O. Conde. Vocês foram fundamentais na execução deste trabalho;

Às colegas Fernanda de Rezende Pinto e Viviane de Souza pelo apoio durante o experimento;

Aos queridos amigos Laryssa Freitas Ribeiro, Mariana Candelaria Miziara, Claudia Scholten, Felipe Jorge da Silva, Mônica C. Oliveira, Natalia M. Nespolo e Roberta de Salles, representando todos os graduandos e alunos da pós-graduação que participaram deste momento tão especial da minha vida;

Aos meus irmãos Kaliza Merino de Medeiros Godoy e Alberto Antonio Ivo de Medeiros Filho representando toda a família (cunhados, tios e primos) pelo apoio e torcida por mais uma etapa vencida;

Aos meus sobrinhos Murilo Medeiros Matthiesen e Miguel Medeiros Godoy por me fazerem sentir o amor verdadeiro;

Aos meus queridos amigos da CNSA e segunda família, Claudia Scholten, Luciano Menezes Ferreira, Maria Auxiliadora Gorga Luna e Maria do Rosário Lira Castro pela amizade, convívio e grande apoio;

Aos meus amigos da APTA - Centro Leste; Flávia F. Simili, Isabel F. P. Viegas, Sally F. Blat, Vera Lucia Cardoso, Lenira El Faro, Luis Carlos Roma Jr., Roberto B. Ferraz Branco e Claudia C. Paro de Paz representando todos os colegas pela amizade, força e carinho;

À minha parceira de laboratório na Espanha, Victoria Ruz Gil, pela amizade e carinho de irmã;

Aos amigos Dr. Fernando Garcia Viejo e Dr. Rafael Jordano pelos ensinamentos e amizade durante meu estágio no Laboratório de Saúde Pública e UCO na cidade de Córdoba – Espanha;

Aos técnicos de Laboratório da UCO e Saúde Pública de Córdoba – Espanha, pelo carinho e auxílio prestado;

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade do curso de pós-graduação;

A Universidade de Córdoba - UCO – Andaluzia – Espanha, pela oportunidade de conhecer novas tecnologias;

A APTA e ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL pelo incentivo e apoio na realização deste doutoramento;

A CAPES pela bolsa PDEE concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro;

Aos demais colegas que pela ajuda e amizade, contribuíram para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão;

E, em especial, a **DEUS**, pelo privilégio da vida e por iluminar sempre meu caminho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Quadros.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Queijo.....	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> e toxinas estafilocócicas.....	4
2.3. Caracterização molecular dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.4. Estudo epidemiológico-molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Caracterização da micro-usina de beneficiamento de leite.....	18
4.2. Obtenção das amostras.....	19
4.2.1. Colheita das amostras.....	19
4.2.2. Amostras de leite.....	21
4.2.3. Amostras obtidas das mãos do manipulador.....	21
4.2.4. Amostras da água utilizada para higienização dos equipamentos.....	21
4.2.5. Amostras dos equipamentos e tubulações.....	21
4.2.6. Amostras dos queijos.....	22



4.3. Exames laboratoriais.....	22
4.3.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase positivos.....	22
4.3.2. Contagem em placa das colônias sugestivas de estafilococos isolados do queijo.....	22
4.3.3. Teste da catalase.....	23
4.3.4. Teste da coagulase livre em tubo.....	23
4.3.5. Teste de Voges-Proskauer .....	24
4.3.6. Análise das amostras de água.....	24
4.4. Caracterização molecular dos isolados.....	25
4.4.1. Extração de DNA.....	25
4.4.2. Amplificação de fragmentos de DNA para identificação do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
4.5. Eletroforese em gel de campo pulsado ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE).....	28
4.6. Classificação dos pulsotipos.....	30
4.7. Amplificação dos genes codificadores das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1.....	30
4.8. Determinação do potencial toxigênico de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase positivos de acordo com pontos de colheita das amostras.....	34
5.2. Amplificação de fragmentos de DNA genômico para identificação do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
5.3. Eletroforese em gel de campo pulsado.....	39

5.4. Amplificação de fragmentos de DNA genômico dos genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e da toxina TSST-1.....	43
5.5. Determinação do potencial toxigênico de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
6. CONCLUSÕES.....	49
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51

## Lista de Tabelas

	<b>Página</b>
Tabela 1. Distribuição das 74 estirpes de estafilococos coagulase positivos de acordo com os pontos de colheita das 140 amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	34
Tabela 2. Distribuição das 41 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> confirmadas pela PCR de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	36
Tabela 3. Padrões de restrição do DNA genômico das 41 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	41
Tabela 4. Distribuição das 25 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> com a presença de genes codificadores de toxinas confirmados pela PCR de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	45

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Exemplos de pontos de colheita relacionados ao processamento do Queijo Tipo Minas Frescal em micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	20
Figura 2. Exemplo de colônias sugestivas de estafilococos em meio <i>Baird-Parker</i> isoladas do leite cru de micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	23
Figura 3. Teste da coagulase livre em tubo de estirpe de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado do Queijo Tipo Minas Frescal de micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.....	24
Figura 4. Eletroforograma da ATCC 25923, utilizada como cepa controle positivo nas análises moleculares para confirmação da espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
Figura 5. Eletroforograma gerado de algumas amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
Figura 6. Padrões de restrição do DNA genômico das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> , submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	39
Figura 7. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais do DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> em PFGE.....	40
Figura 8. Produto da reação de amplificação de algumas amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> com os genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tst</i> .....	44

## Lista de Quadros

	<b>Página</b>
Quadro 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Brasil) utilizados para identificação da espécie de <i>Staphylococcus aureus</i> e o tamanho do fragmento esperado.....	27
Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Brasil) utilizados para identificação das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico, TSST-1 e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.....	32

## **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL**

**RESUMO** – Foi realizado o estudo epidemiológico molecular de estirpes de *Staphylococcus aureus* potencialmente toxigênicas isoladas no processo de produção do Queijo Tipo Minas Frescal em uma micro-usina no Estado de São Paulo. Para tanto, foram realizadas seis amostragens durante o período de junho de 2008 a julho de 2009, de modo a perfazer um total de 140 amostras, as quais foram colhidas do leite cru e pasteurizado, mãos do manipulador, queijo embalado para consumo e diversos pontos do fluxograma de seu processamento. A confirmação molecular da espécie dos isolados e a presença de genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e da toxina TSST-1, foram realizadas a partir da amplificação dos fragmentos de DNA genômico específico. Entre as 41 (29,3,4%) das estirpes confirmadas como sendo *S. aureus*, 25 (61%) mostraram-se positivas na pesquisa de genes codificadores de toxinas estafilocócicas. Os pontos de maior frequência de estirpes de *S. aureus* toxigênicas foram as mãos do manipulador (16,0%), o leite cru do tanque de recepção (12,0%), o leite pasteurizado (12,0%) e o Queijo Tipo Minas Frescal pronto para consumo (12,0%). O gene codificador de enterotoxina de maior frequência identificada foi o *sea*. Na determinação do potencial toxigênico das estirpes com genes codificadores de enterotoxinas por imunodifusão, apenas uma estirpe isolada da superfície interna do tanque de estocagem do leite cru foi produtora da enterotoxina SEC. Houve variabilidade genética entre as 41 estirpes de *S. aureus* isoladas, uma vez que foram identificados 22 pulsotipos diferentes pelo PFGE. Os resultados obtidos permitem a adoção de medidas para a melhoria do processamento do Queijo Tipo Minas Frescal de modo a reduzir o risco potencial que estas toxinas podem representar para a saúde da população consumidora deste produto.

**Palavras-Chave:** enterotoxinas, PCR, PFGE, segurança alimentar, TSST-1

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY APPLIED TO THE STUDY OF STRAINS OF  
*Staphylococcus aureus* IN THE PRODUCTION OF FRESCAL MINAS  
TYPE CHEESE**

**SUMMARY** - ABSTRACT - We performed molecular epidemiological study of strains of *Staphylococcus aureus* isolated to assess their toxigenic potential in the process of producing the Frescal Minas Type Cheese in a micro-mill in State of São Paulo. For this, six samples were taken during the period June 2008 to July 2009 in order to make a total of 140 samples, which were collected from raw and pasteurized milk, the handler's hands, cheese packaged for consumption and different points in the flowchart of processing. Confirmation of the molecular species of the isolates and the presence of genes encoding enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED and TSST-1 toxin, were made from the amplification of specific fragments of genomic DNA. Among the 41 (29.3%) of strains confirmed as *S. aureus*, 25 (61%) were positive in the research of genes encoding staphylococcal toxins. Points with higher frequency of toxigenic strains of *S. aureus* were the hands of the handler (16.0%), raw milk receiving tank (12.0%), pasteurized milk (12.0%) and Frescal Minas Type Cheese ready for consumption (12.0%). The gene encoding enterotoxin most frequently identified was the *sea*. In determining the potential toxigenic strains with genes encoding enterotoxins by immunodiffusion, only one strain isolated from the inside surface of the storage tank of raw milk was the producer of enterotoxin SEC. There was genetic variability among the 41 strains of *S. aureus* isolated, since they were identified by 22 different PFGE pulsotypes. The results obtained allow the adoption of measures to improve the processing of Frescal Minas Type Cheese to reduce the potential risk that these toxins can pose to the health of consumers of this product.

**Keywords:** enterotoxins, food safety, PCR, PFGE, TSST-1

## 1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é essencial para os consumidores e para todos os órgãos responsáveis pela Saúde Pública.

O leite, devido a sua composição, é considerado um dos alimentos mais nobres nutricionalmente, mas um ótimo substrato para a multiplicação de micro-organismos. É a principal matéria prima para a elaboração do queijo devendo-se priorizar sua qualidade físico-química e microbiológica além de um cuidado especial durante seu processamento para que o produto final não seja um risco potencial para a saúde dos consumidores.

O Queijo Tipo Minas Frescal é bastante produzido pela indústria de laticínios, sendo comercializado a preços acessíveis a grande parte da população. É um queijo não maturado, com elevado teor de umidade, sendo susceptível a contaminações bacterianas.

O *Staphylococcus aureus* é conhecido como um dos principais agentes causadores da mastite subclínica causando danos à glândula mamária comprometendo as características físico-químicas e microbiológicas do leite sem que o produtor perceba sua presença. Por se tratar de um micro-organismo patogênico que apresenta uma grande capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, representa um importante agente de toxi-infecção alimentar. A presença de *Staphylococcus* nos alimentos é encarada como um indicador de deficiências de carácter higiênico no processo de obtenção do alimento e particularmente nas operações de manipulação.

Quando não há uma higienização eficiente dos equipamentos e tubulações relacionadas ao processamento do queijo este micro-organismo se adere, interagindo com as superfícies e iniciando uma multiplicação celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, forma-se o biofilme, dificultando ainda mais a eliminação destes micro-organismos.



A contaminação cruzada da transmissão do *S. aureus* é facilmente identificada dentro do fluxograma de produção do Queijo Tipo Minas Frescal. Sendo assim, este produto pode representar um risco à saúde pública se não forem seguidos com rigor cuidados higiênicos sanitários durante o processo de produção.

O Queijo Minas Tipo Frescal é um queijo elaborado com leite pasteurizado, mas o processo de aquecimento utilizado na pasteurização do leite inativa os *Staphylococcus*, mas não as toxinas previamente produzidas, que permanecem ativas nos alimentos por um longo período. Os principais sintomas dessa intoxicação são náuseas, vômito e diarreia, e em idosos, crianças e imunodeprimidos a intoxicação estafilocócica pode ser fatal.

A identificação da presença de genes codificadores de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) em estirpes de *S. aureus* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos pontos envolvidos no processamento do Queijo Tipo Minas Frescal é uma ferramenta importante para avaliar o risco potencial deste produto para o consumidor final.

A caracterização exata dos patógenos se faz imprescindível para a detecção dos locais de contaminação do processamento, além de permitir o estudo da disseminação de estirpes bacterianas.

Diante das poucas informações disponíveis sobre a epidemiologia do *S. aureus* na produção do Queijo Tipo Minas Frescal, foi escolhida para estudo uma micro-usina produtora no Estado de São Paulo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Queijo

O leite é composto de carboidratos, vitaminas, proteínas e sais minerais sendo considerado alimento completo para o consumo humano por possuir alto valor biológico. A utilização do leite como matéria prima no preparo de derivados é amplamente utilizado, mas o mesmo deve ser obtido em condições higiênico-sanitárias ideais e ser resfriado logo após sua obtenção, pois os elementos contidos no leite formam um excelente substrato para a multiplicação de micro-organismos, afetando a qualidade do produto final. Considerando que a principal matéria prima do queijo é o leite deve haver uma maior preocupação com esse produto (ALBUQUERQUE & RODRIGUES, 2008).

Segundo ARAÚJO et al. (2001a), o queijo é uma das formas mais antigas de conservação do leite, e surgiu praticamente com a domesticação de animais produtores de leite. Tem ampla aceitação comercial, pois atende aos paladares mais exigentes, fazendo parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país (LEITE et al., 2005). A produção de queijo modifica a microbiota bacteriana do leite para evitar, até certo ponto, a multiplicação de patógenos (ALMEIDA & FRANCO, 2003).

O Queijo Tipo Minas Frescal foi desenvolvido no Brasil nas produções artesanais no Estado de Minas Gerais, tendo sua definição tecnológica em 1930 (SANTOS, 2004). A fabricação do queijo apresenta vários pontos críticos, durante a fabricação, que podem conduzir a alterações e até recontaminação no produto final (ROSA et al., 2005).

A partir da década de 80 a produção do Queijo Tipo Minas Frescal superou a do Queijo Minas curado (SANTOS, 2004). Em um levantamento em 2000 o Queijo Tipo Minas Frescal figurou entre os três queijos mais produzidos pela indústria, ficando atrás somente do Queijo Tipo Mussarela e do Queijo Prato (OMAIRI, 2002).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, o Queijo Tipo Minas Frescal é um queijo fresco branco, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, caracterizado por alta atividade de água, baixo pH (5,1 –

5,6) e 6% de cloreto de sódio (NaCl) (CAMPOS et al., 2006). Possui de 43 a 55% de umidade e uma vida de prateleira de 10 a 14 dias. Na fabricação, utiliza-se coalho enzimático, remove-se o soro e realiza-se a moldagem e a salga (BRASIL, 1997; PEREIRA et al., 1999a; ISEPON et al., 2003).

Mesmo a legislação brasileira exigindo a utilização de leite pasteurizado no preparo do Queijo Tipo Minas Frescal é frequente a comercialização do produto que não atende a esta especificação legal (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). Temperaturas inadequadas e más condições de manufatura e armazenamento são fatores que também acarretam o desenvolvimento de micro-organismos, comprometendo a qualidade do queijo (PEREIRA et al., 1999b).

A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância para a indústria pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003), além de comprometer suas características sensoriais e torná-lo impróprio para o consumo em virtude da contaminação por micro-organismos (ARAÚJO et al., 2001b).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes, de acordo com a Resolução Colegiada (RDC) n° 12 (BRASIL, 2001) os queijos de alta umidade como o minas frescal elaborado por coagulação enzimática e sem participação de bactérias lácteas deve apresentar tolerância para amostras representativas de  $05 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de estafilococos coagulase positivos.

## **2.2. *Staphylococcus aureus* e toxinas estafilocócicas**

Em 1880, Alexander Ogston isolou um grupamento de bactérias em forma de cocos do pus de feridas e concluiu que estes eram causa de várias doenças piogênicas no ser humano. No ano de 1884, Vaughan e Sternberg relatam após um grande surto ocorrido em Michigan - EUA, em que o alimento envolvido era o queijo, o primeiro caso de *Staphylococcus* responsável por intoxicação alimentar, sendo assim o papel etiológico do *Staphylococcus* pela primeira vez demonstrado (BAIRD-PARKER, 1990). No mesmo ano de 1884, Rosenbach constatou a existência de dois tipos de colônias que cresciam em meio sólido: uma de coloração branca e outra amarela. O autor

nomeou os micro-organismos especificamente como *Staphylococcus pyogenes aureus* (colônias amarelas) e *Staphylococcus pyogenes albus* (colônias brancas). A nomenclatura trinomial foi abandonada, e as bactérias foram então denominadas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (SILVA JÚNIOR, 2002).

A relação evidente destes micro-organismos com a enfermidade transmitida por alimentos não se estabeleceu até que Barber, em 1914, demonstrou que os estafilococos eram capazes de causar uma intoxicação ao consumir o leite procedente de uma vaca com mastite estafilocócica. Posteriormente, Dack em 1930 demonstrou finalmente que a intoxicação alimentar estafilocócica era causada por uma enterotoxina (BAIRD-PARKER, 1990).

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* pertencem a família *Micrococaceae*. É composto por cocos Gram positivos, imóveis, mesófilos, não esporulados e agrupados irregularmente em forma de cachos. Catalase positivos e anaeróbios facultativos. (DOWNES & ITO, 2001).

Alguns fatores de virulência dos estafilococos são associados à sua capacidade enterotoxigênica, entre eles a produção de coagulase (PEREIRA et al., 2000; PEREIRA & PEREIRA, 2005). O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase negativas, com exceção do *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini* (BANNERMAN et al., 2003; KWOK & CHOW, 2003).

MELO (2008) e SANTOS (2009b) demonstraram a capacidade do *S. aureus* na formação de biofilmes em equipamentos de ordenha e de micro-usina respectivamente. MARQUES (2005) explica que a adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam sua multiplicação. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme.

Devido a sua halotolerância, o agente também se multiplica em ambientes com altas concentrações de sal e, portanto tem sido frequentemente associado a intoxicação

alimentar pela ingestão de alimentos conservados pela salga, como por exemplo a carne de sol e os embutidos crus (SILVA, 2000).

Seres humanos e animais são os principais reservatórios de *S. aureus*, sendo a cavidade nasal do ser humano seu principal habitat (FRANCO & LANDGRAF, 1996; WONG & BERGDOLL, 2002).

Em razão dos estafilococos serem comumente encontrados além das fossas nasais, na garganta e na pele de portadores humanos, estudos epidemiológicos de surtos de intoxicação estafilocócica têm apontado os manipuladores como a principal fonte de contaminação do alimento (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; SMITH & HOGAN, 1993; PEREIRA et al., 1999c). ASSUMPÇÃO et al. (2003) enfatizaram que a manipulação incorreta dos alimentos pode causar contaminação posterior, mesmo após o produto ser submetido a tratamento térmico. Os dados obtidos sobre a incidência de *S. aureus* em queijo prato mostraram que a população de estafilococos coagulase positivos verificada nas mãos e antebraços de manipuladores seria a fonte de recontaminação do queijo analisado. Manipuladores de alimentos com mãos e braços que apresentem feridas infectadas com *S. aureus* têm destaque como fontes de contaminação do alimento (SILVA JÚNIOR, 2002).

*S. aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina podendo estar presente no leite, especialmente naquele proveniente de vacas com mastite subclínica e que a maioria dos produtores não identifica (MEDEIROS & SOUZA, 2008; FERREIRA, 2008).

ZAFALON et al. (2008), em trabalho realizado em Nova Odessa-SP, isolaram *S. aureus* do leite, óstios e insufladores, porém não isolaram do leite do tanque de expansão, da água de lavagem dos insufladores e da oriunda das torneiras para a lavagem dos tetos. Em outro trabalho, realizado por ZAFALON et al. (2009), verificou-se em pesquisa no ambiente de ordenha, que das 245 estirpes isoladas de diversos pontos, um total de 150 (61%) *S. aureus* foram isolados no leite de quartos mamários com mastite, destacando-se a importância deste patógeno na diminuição da qualidade da matéria prima.

*S. aureus* pode ser encontrado de forma esporádica no solo, partículas de poeira, sedimentos marinhos, água doce, efluentes de esgoto e superfície de plantas

(PEREIRA et al., 2000). Segundo dados de AMARAL et al. (2003), *S. aureus* foi isolado na água de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, demonstrando a importância do cuidado com a qualidade da água utilizada para consumo, higienização e elaboração de produtos.

A detecção do *S. aureus* em queijos elaborados com leite pasteurizado pode ser fruto de sua contaminação posterior, lembrando que o tratamento térmico é eficiente em eliminar células viáveis dessas bactérias (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989).

Entre as 80 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal analisadas na cidade de Poços de Caldas – MG, por ALMEIDA FILHO & NADER FILHO (2000), 40 (50,0%) apresentaram contagens de *S. aureus* acima do limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde para o Queijo Tipo Minas Frescal produzido industrialmente.

WENDPAP & ROSA (1993) em estudo do Queijo Tipo Minas Frescal consumido na cidade de Cuiabá – MT, detectaram *S. aureus* em 40% das amostras analisadas apresentando contagens acima de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. HOFFMAN et al. (2002) analisaram 10 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal comercializados em feiras na Região de São José do Rio Preto – SP e constataram todas fora do padrão permitido para *S. aureus*. GOMES & GALLO (1995) analisaram Queijos Tipo Minas Frescal comercializados na cidade de Piracicaba – SP e encontraram contagens variando de  $4,7 \times 10^4$  a  $1,4 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de *S. aureus*.

Em condições favoráveis este micro-organismo multiplica-se no alimento, produzindo toxinas, sem que seja alterada significativamente a cor, o aroma e o sabor (SANTOS, 1997). Segundo CARMO et al. (2002), o processo de pasteurização do leite inativa os *Staphylococcus* spp., mas suas toxinas previamente produzidas permanecem ativas. Assim, este produto pode representar um risco potencial à saúde pública se não forem seguidos com rigor cuidados higiênicos e sanitários durante o processo de produção (VOLKMAN et al., 2002; FERREIRA, 2008; SOUZA, 2010). Por se tratar de uma matéria prima indispensável para a produção de queijos e demais derivados, é importante que o leite apresente uma boa qualidade.

De acordo com JARRAUD et al. (1999) e AKINEDEN et al. (2001), as estirpes de *S. aureus* patogênicas podem produzir enterotoxinas dos tipos A a E e G a J (SEA,

SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ), toxinas esfoliativas dos tipos A e B (ETA, ETB) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que são responsáveis por causar, em humanos, toxinfecções alimentares, alergias e até mesmo desordens multi sistêmicas que podem levar à morte.

A presença de amostras toxigênicas de *S. aureus* não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, pois um micrograma de toxina é suficiente para causar os sintomas característicos da intoxicação, principalmente em crianças, imunodeprimidos e idosos (CARDOSO et al., 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Os principais sintomas da intoxicação estafilocócica são náuseas, vômito, câibras abdominais e diarreia. O período de incubação varia de 30 minutos a oito horas, sendo em média entre duas e quatro horas (SU & WONG, 1997; DINGES et al., 2000; WONG & BERGDOLL, 2002; LOIR et al., 2003) e a recuperação completa entre um e três dias (SU & WONG, 1997). Em idosos, imunodeprimidos e crianças, a intoxicação estafilocócica pode ser fatal (CLEMENTE et al., 2003).

As intoxicações estafilocócicas ocorrem devido à ingestão de toxina pré-formada no alimento, e são frequentemente associadas à ingestão de alimentos com contagens entre  $10^5 - 10^6$  UFC de estafilococos por grama ou mililitro. (LANCETTE & TATINI, 1992; PARK et al., 1992; WONG & BERGDOLL, 2002).

A produção de enterotoxinas por *S. aureus* depende de distintos fatores, como requerimentos nutricionais, temperatura, sais, pH, atividade de água, etc. Pode-se dizer que com condições de multiplicação adequadas de temperatura entre 10 - 45°C (SMITH et al., 1983), uma atividade de água entre 0,84 - 0,90 e dependendo das condições de aerobioses ou anaerobioses respectivamente poderá ocorrer a produção de enterotoxinas (TRANter & BREHM, 1990).

*S. aureus* também requer certos componentes orgânicos para sua nutrição, e isto influi na produção ou não de enterotoxinas. Pode-se citar como exemplo que a presença de arginina é essencial para a produção de enterotoxinas B (WU & BERGDOLL, 1971). O micro-organismo tolera altas concentrações de sais, mas esta pode limitar a produção de enterotoxinas. Trabalhos demonstram que a quantidade de

enterotoxina A (MARKUS & SILVERMAN, 1970) e de enterotoxina B (GENIGEORGIS & SADLER, 1966) diminuem com o incremento dos níveis de NaCl.

A presença de enterotoxinas por *S. aureus* foi associada durante muito tempo com a produção pelo micro-organismo da enzima coagulase, mas esta associação foi posteriormente derrubada por vários autores que encontraram estirpes coagulase negativas produtoras de enterotoxinas (BERGDOLL, 1967; DANIELSSON & HELLBERG, 1977; OLSVICK et al., 1982; VALLE et al., 1990; MARIN et al., 1992). Estudos comprovam que *Staphylococcus* coagulase negativos podem ser a causa de intoxicações por ingestão de alimentos com enterotoxinas (BERCKINRIDGE & BERGDOLL, 1971; SORIANO et al., 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas em pequenas quantidades durante a maior parte da fase de multiplicação exponencial (NOLETO et al., 1982). Geralmente existe um aumento importante da produção durante o final da fase exponencial ou no princípio da fase estacionária (BETLEY et al., 1992).

Uma propriedade complementar das enterotoxinas estafilocócicas que tem importância com o surgimento de intoxicação alimentar é sua resistência à inativação pelas proteases que existem no trato gastrointestinal. A resistência à pepsina, especialmente em um meio de pH relativamente baixo, é uma exigência chave para a atividade das enterotoxinas *in vivo*. Todas as enterotoxinas estafilocócicas possuem certa resistência à pepsina (BERGDOLL et al., 1959; BALABAN & RASOOLY, 2000)

O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *S. aureus* isolado de animal foi feito por JONES & WIENEKE (1986). KENNY et al. (1993), relataram a presença de uma ou mais toxinas em 28,6% das amostras de *S. aureus* isoladas em casos de mastite bovina. Neste estudo, as toxinas mais isoladas foram SEC, SED e TSST-1. Outros estudos realizados com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstraram que entre 20% e 77% dos isolados produziram TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas (MATSUNAGA et al., 1993; ICHIKATIVIDADE DE ÁGUAA et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1998).

ZAFALON et al. (2009) encontraram a prevalência do gene *sea* no leite das vacas com mastite em estudo do ambiente de ordenha prevalecendo em duas estações



climáticas estudadas, chuvosa e seca (35% / 57%). SILVA et al. (2005) encontraram em estudo realizado com rebanho bovino no Brasil, 4 (6,3%) de amostras positivas para os genes *sea* e *seb* e 2 (3,1%) positivas para o gene *sec* nos 64 isolados de leite mastítico.

A enterotoxina mais frequentemente isolada de alimentos, implicados em surtos de intoxicações alimentares é a enterotoxina A e a segunda de importância casuística é a enterotoxina D (WIENEKE & GILBERT, 1987). A detecção do gene da enterotoxina A em linhagens de *S. aureus* é importante, visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). SCHERRER et al. (2004) verificaram, em leite de cabras obtido de tanques de expansão, a presença deste gene em 28 (14,6%) estirpes de *S. aureus*.

A presença de genes codificadores de enterotoxinas não indica, necessariamente, a capacidade do micro-organismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas (MCLAUHLIN et al., 2000). No entanto, o simples fato de uma estirpe conter um ou mais genes codificadores de enterotoxinas deve ser significativo, pois pode oferecer risco à saúde pública caso o micro-organismo encontre condições favoráveis à produção de enterotoxinas.

A intoxicação alimentar estafilocócica se classifica como uma das causas mais frequentes de gastroenterites em todo o mundo e é chamada de intoxicação, pois não requer a multiplicação do micro-organismo no hospedeiro. (DOYLE, 2001). De acordo com *Center For Disease Control* nos EUA, as bactérias são responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 95% dos casos de toxinfecções alimentares (ANDRADE et al., 2003). Anualmente somente nos Estados Unidos, segundo LAMPS (2003), ocorrem mais 1.300 surtos de origem alimentar, envolvendo, aproximadamente, 76 milhões de indivíduos, com 325 mil internações e cinco mil mortes.

A intoxicação por enterotoxinas de *S. aureus* é a segunda causa mais frequente de doenças de origem alimentar na Espanha e na França, depois de *Salmonella* e em números similares ao *Clostridium perfringens*. Na França, em 1997, *S. aureus* foi identificado como o agente etiológico em 569 de 1142 casos registrados de intoxicações. Os casos não esclarecidos podem ser explicados pela presença de outros

estafilococos, coagulase positiva ou negativa, ou pela produção de outras enterotoxinas, que não as clássicas (ROSEC & GUIRAUD, 2002; MARTIN et al., 2004).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998) foram registrados 593.212 casos de intoxicação alimentar entre 1984 e 1997, porém sem especificar as toxinas, os micro-organismos ou as fontes envolvidas.

CARMO et al. (2002) verificaram vários surtos relacionados a estirpes de *S. aureus* enterotoxigênicas em Manhuaçu e Passa-Quatro - MG, Brasil. Num primeiro surto, 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de Queijo Tipo Minas Frescal e, num segundo surto, foram afetados 328 indivíduos após consumirem leite cru.

Outros estudos como de REALI (1982) e MEYRAND et al. (1998) documentaram grande número de casos de intoxicação estafilocócica por consumo de leite e queijos, respectivamente.

Equipamentos e utensílios contaminados com higienização deficiente são responsáveis por aproximadamente 16% dos surtos notificados (FREITAS, 1995). Em pesquisa realizada por TAKEUCHI et al. (1998), 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas de tanques de expansão utilizados para resfriamento e armazenamento de leite demonstraram capacidade de produzir toxinas.

SANTOS & GENIGEORGIS (1981), estudaram a capacidade do *S. aureus* sobreviver, multiplicar e produzir enterotoxinas no Queijo Tipo Minas Frescal. Populações de *S. aureus* maiores que  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> foram observadas neste estudo em 57 (44%) dos queijos elaborados com leite pasteurizado e detectadas produções de enterotoxinas do tipo A, B e C por 10 das 16 estirpes isoladas. DELAZARI et al. (1978) e MANDIL et al. (1982) comprovaram a produção da enterotoxina A quando a população do *S. aureus* atingia contagens de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> em Queijo Tipo Minas Frescal. CARMO (2001) relata toxinfecções alimentares causadas pela ingestão de toxinas estafilocócicas em diversos queijos no Estado de Minas Gerais no período de 1995 a 2001, sendo 23 surtos, com 660 pessoas intoxicadas e um óbito.

### 2.3. Caracterização molecular dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Os métodos tradicionais de isolamento e identificação de micro-organismos de alimentos geralmente são lentos, de alto custo e em muitas ocasiões padecem de uma adequada sensibilidade e especificidade. Por tudo isso se estima que mais de 60% dos surtos reconhecidos como toxinfecções alimentares nunca alcançam um diagnóstico da etiologia infecciosa (BEAN et al., 1990).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), propicia um método de detecção e identificação direta de patógenos (MEYER et al., 1991).

A outra vantagem é que devido o DNA estar presente tanto em células ativas como em inativadas, a PCR apresenta uma importante propriedade quando se pretende detectar micro-organismos como o *S. aureus*, capazes de produzir toxinas termo resistentes. A comparação do método PCR com os métodos tradicionais de cultivo para a detecção de micro-organismos patógenos em alimentos indica que a PCR é a técnica de maior sensibilidade (ALLMAN et al., 1995), destacando novamente que as células não viáveis que não são cultiváveis podem ser detectadas mediante técnicas de ácidos nucleicos (PEDERSEN & JACOBSEN, 1993). A diferenciação entre células cultiváveis e não cultiváveis, mas ainda viáveis podem ser realizadas mediante um enriquecimento prévio. Por este motivo a PCR é uma técnica de grande utilidade na identificação rápida dos micro-organismos que dispõem de sequências de DNA específicas.

No ano 1990 foram descritos os primeiros métodos para a detecção de micro-organismos patógenos em alimentos mediante a PCR (BORDER et al., 1990; BESESSEN et al., 1990). Desde seu surgimento a biologia molecular é muito utilizada em diagnósticos médicos e na detecção de patógenos em alimentos (JONES & BEJ, 1994; RIJPENS & HERMAN, 2002). Já a sua utilização como método de análise de micro-organismos responsáveis pela deterioração dos alimentos e de micro-organismos que interferem nos processos de fermentação na biotecnologia alimentar são mais recentes (SCHEU et al., 1998).

A amplificação, pela técnica de PCR, das sequências codificadoras das enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*) e toxina da

síndrome do choque tóxico (*tst*) constitui técnica simples, rápida e sensível para detecção da potencial capacidade do agente produzir toxinas (JOHNSON et al., 1991). A técnica de PCR apresenta três etapas: extração do ácido nucléico, sua amplificação e posterior visualização do produto. O desempenho satisfatório do método depende, entre outros, da escolha acertada dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e da técnica utilizada na extração do ácido nucléico da amostra (COLLINS et al., 1994). Essa técnica também é utilizada para a amplificação das sequências codificadoras das enterotoxinas *seg*, *seh*, *sei* e *sej* (JARRAUD et al., 1999; AKINEDEN et al., 2001).

O primeiro estudo de caracterização genotípica de isolamentos de *S. aureus* associados com surtos de intoxicação alimentar registrados em distintas províncias argentinas por MANFREDI et al. (2010) demonstraram que de um total de 115 isolamentos de *Staphylococcus* spp., sendo 61 confirmados como *S. aureus* pela PCR, 34 (55,7%) possuíam o gene *sea*, 9 (14,8%) o gene *seb*, 5 (8,1%) o gene *see*, 4 (6,5%) o gene *sec*, 6 (9,9%) os genes *sea* e *seb*, 2 (3,3%) os genes *sea* e *sec*, e 1 (1,7%) os genes *sea* e *sed*.

#### **2.4. Estudo epidemiológico-molecular de *Staphylococcus aureus***

Entende-se que a diferenciação de estirpes é fundamental para o estudo epidemiológico de doenças infecciosas. Por este motivo, deve ser capaz de discriminar isolados não relacionados, bem como classificar isolados epidemiologicamente relacionados em um mesmo grupo (FRÉDAY et al., 1996). Na tentativa de se contornar as limitações de outras 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 (DOLZANI et al., 1994).

Entre as técnicas de análise genotípica, a eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) de fragmentos obtidos por restrição demonstra ser o método de maior sensibilidade podendo detectar variações genéticas

entre isolados bacterianos filogeneticamente e epidemiologicamente relacionados, inclusive *S. aureus* (ZADOKS et al., 2002).

Segundo TENOVER et al. (1995), por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas e ser um bom método para estabelecimento de relações clonais em estudos epidemiológico-moleculares para o *S. aureus* a técnica de PFGE é sem dúvida uma ferramenta de tipagem de maior poder discriminatório. Nela, padrões de restrição de genomas bacterianos completos são analisados e comparados. O cromossomo bacteriano é digerido por uma endonuclease de restrição de corte raro, com o objetivo de produzir um número moderado de fragmentos de DNA. Os micro-organismos imobilizados na mistura da suspensão bacteriana em agarose fundida antes da lise celular protege o DNA bacteriano de danos mecânicos. Os blocos contendo DNA purificado e digerido são inseridos em géis de agarose e seus fragmentos são separados por eletroforese em gel de campo pulsado, no qual a orientação do campo elétrico sofre alternância. Os perfis de restrição de DNA dos isolados são comparados para determinar a relação entre eles (TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997; LUKINMAA et al., 2004).

Cada espécie de micro-organismos exige a aplicação de uma enzima de restrição que melhor aponte as variações entre estirpes e, no caso de *S. aureus*, a enzima *SmaI* é a mais indicada (VAN BELKUM et al., 1998).

É importante ressaltar que fatores como a composição e concentração de agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e tempo de corrida eletroforética são importantes para a resolução final da PFGE. Outros fatores também podem afetar o limite de resolução da técnica como o grau de uniformidade, a força relativa dos campos elétricos, o ângulo entre os campos elétricos que se alternam de acordo com cada aparelho utilizado, a temperatura de corrida e ainda, a integridade do DNA (MAGALHÃES et al., 2005).

Seguindo os critérios de interpretação dos resultados de PFGE definidos por TENOVER et al. (1995), são consideradas três classes de relação entre os isolados: os isolados que apresentam até três bandas diferentes são considerados relacionados, isolados apresentando de quatro a seis bandas diferentes são classificados como

possíveis relacionados e os isolados que apresentam sete ou mais bandas diferentes são considerados não relacionados.

A relação de similaridade entre dois isolados, segundo TENOVER et al. (1995), pode ser estimada com base nos critérios de interpretação para os padrões de fragmentos de bandas, produzidos pela digestão do DNA genômico com a enzima *Sma*I. Dois isolados são considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentem o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desses resultados é que os isolados são considerados derivados de uma mesma estirpe.

SINGH et al. (2006), destacam que as amostras são consideradas idênticas se mostrarem 100% de similaridade e são consideradas clonalmente relacionadas se apresentarem similaridade superior a 80% podendo utilizar o dendrograma para ilustrar relações filogenéticas e proporcionar uma representação visual de linhagens, similaridades e diferenças genéticas entre grupos.

Sendo a PFGE uma técnica muito complexa e com um poder discriminatório muito elevado pode ser considerada como padrão ouro em Epidemiologia Molecular, porém MAGALHÃES et al. (2005), ressaltam que métodos de tipagem auxiliam e não substituem dados epidemiológicos e se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas.

FERREIRA (2008) observou após submeter 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, à PFGE que houve a manutenção e a disseminação clonal dos pulsotipos identificados nas amostras analisadas revelando 39 pulsotipos distintos, dos quais 25 (64,1%) encontraram-se distribuídos nas 137 (55,9%) estirpes obtidas do leite.

Trabalho realizado em onze rebanhos nos Estados de São Paulo e Pernambuco por SANTOS (2009a) identificou 32 perfis genéticos, agrupados em 12 linhagens, a partir dos 107 isolados de leite, material de insufladores, pele do úbere, mãos e fossas nasais de ordenhadores.

SOUZA (2010) encontrou heterogeneidade genética entre 103 estirpes de *S. aureus* isoladas, uma vez que foram identificados 32 pulsotipos diferentes em pontos do fluxograma de produção do leite em 16 propriedades de Sacramento – MG.

Diante do alto consumo de Queijo Tipo Minas Frescal no Brasil e a importância de estudos sobre a dinâmica de estirpes de *S. aureus* toxigênicos dentro do fluxograma de produção a fim de mitigar o risco potencial que este produto possa oferecer à saúde pública, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de atingir os objetivos que serão apresentados a seguir.

### 3. OBJETIVOS

- Estudar as estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas na contaminação do Queijo Tipo Minas Frescal por meio do isolamento do patógeno e técnicas fenotípicas e genotípicas;
- Investigar a presença de enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico e as suas sequências codificadoras.
- Investigar a persistência dos padrões genotípicos e a dinâmica das estirpes de *Staphylococcus aureus* no ambiente de produção;
- Verificar o risco potencial que o Queijo Tipo Minas Frescal produzido nesta micro-usina representa aos consumidores como veículo de toxinas estafilocócica.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da micro-usina de beneficiamento de leite

Foi estudada uma micro-usina de beneficiamento estabelecida há 19 anos no Estado de São Paulo, cujo volume diário de leite beneficiado situava-se em torno de 4.700 litros, oriundos de 21 produtores rurais. A micro-usina, além do beneficiamento do leite produzia diariamente cerca de 500 litros de bebida láctea e, semanalmente, 200 litros de iogurte, 16 Kg de ricota e 70 Kg de Queijo Tipo Minas Frescal objeto deste estudo.

A fonte de água utilizada para a limpeza e elaboração dos produtos era representada por um poço semi-artesiano. Com o objetivo de melhorar a qualidade da água utilizava-se diariamente um dosador de cloro líquido na caixa d'água com a dosagem fixada em 3 ppm, além de avaliação do pH.

A micro-usina estudada possuía um pasteurizador com capacidade para 1.200 litros/hora, era subordinada à fiscalização do Sistema de Inspeção do Estado de São Paulo (SISP) e recebia a assistência de um Médico Veterinário como Responsável Técnico. Diariamente eram realizadas pelo proprietário após o recebimento da matéria prima, as provas da redutase, crioscopia, alizarol e teor de cloretos no leite cru.

O proprietário da micro-usina enviava amostras de leite mensalmente à Clínica do Leite – Piracicaba – SP, onde a contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e pesquisa de resíduos de antibióticos eram realizadas. O proprietário também enviava mensalmente ao Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp de Jaboticabal – SP, amostras da matéria prima e dos produtos prontos para a comercialização para a realização de análises para controle de coliformes termotolerantes, contagem de micro-organismos mesófilos, teor de gordura e sólidos totais. A investigação da presença e o estudo epidemiológico do *S. aureus* nesta micro-usina nunca haviam sido realizados, o que facilitou a execução deste trabalho.

## **4.2. Obtenção das amostras**

### **4.2.1. Colheita das amostras**

Foram realizadas seis amostragens durante os meses de junho de 2008 a julho de 2009, perfazendo um total de 140 amostras as quais foram colhidas da superfície interna de latões de leite (06), dos tanques de recepção (10) e estocagem (10) do leite cru e do tanque de equilíbrio (10) do leite pasteurizado, além do leite cru (12), o leite pasteurizado (12), queijo embalado para a comercialização (12), a água (12), e suabes das tubulações [cano de saída do Pasteurizador (6) e tubo de envio do leite até a queijaria (6)], equipamentos [mesa (06), formas (12), lira (06), tamber (06)], mãos do manipulador (12) e coalho (2). (Figura 1). Os suabes utilizados na amostragem foram acondicionados em tubos de ensaio previamente esterilizados contendo 10 mL de água peptonada a 0,1% (SILVA et al. 2007) e mantidos em caixas isotérmicas com gelo reciclável, bem como as amostras de leite, água e queijo, e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal e Água, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal/SP - Unesp.



**Figura 1.** Exemplos de pontos de colheita relacionados ao processamento do Queijo Tipo Minas Frescal em micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009. (1) tanque de recepção e leite cru, (2) tubulação levando o leite pasteurizado até o tanque de equilíbrio, (3) tambler utilizado no processamento do queijo, (4) lira e mão do manipulador, (5) mão do manipulador e (6) mesa e formas.

#### **4.2.2. Amostras de leite**

Para a colheita das amostras de leite cru oriundas dos tanques de recepção e armazenamento e as amostras do leite pasteurizado do tanque de equilíbrio, realizou-se a homogeneização do leite acionando-se o agitador por um tempo mínimo de cinco minutos. Após a homogeneização, um volume de 10 mL foi retirado com o auxílio de uma concha esterilizada, da parte superior e central do tanque, e acondicionado em frasco de vidro esterilizado (BRITO et al., 1998). Todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

#### **4.2.3. Amostras obtidas das mãos do manipulador**

Suabes estéreis mergulhados em água peptonada a 0,1% foram friccionados nos espaços interdigitais, nos espaços subungueais e sobre as palmas das mãos do manipulador responsável pela elaboração do queijo, e posteriormente mergulhados nos respectivos tubos. Os suabes acondicionados em água peptonada a 0,1% foram transportados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e levados ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana (APHA, 2001).

#### **4.2.4. Amostras da água utilizada para higienização dos equipamentos**

As amostras de água foram colhidas diretamente das torneiras e mangueiras existentes na micro-usina, após desinfecção com álcool a 70% e fogo, bem como drenagem da água durante aproximadamente três minutos em frascos de vidro esterilizados e graduados, em quantidade de 400 mL (APHA, 2001).

#### **4.2.5. Amostras dos equipamentos e tubulações**

Para o cálculo dos valores encontrados nas superfícies dos tanques utilizou-se como base um molde de plástico com área interna de 10 cm x 10 cm = 100 cm<sup>2</sup> obtendo a proporção de 0,1 mL da amostra na diluição em água peptonada para cada 1cm<sup>2</sup> (APHA, 2001). Para as tubulações com 1,25 cm de raio e colhido com suabe até a profundidade de 10 cm, usou-se a fórmula matemática para o cálculo da área

lateral do cilindro =  $2 \pi r h$  (DOLCE & POMPEO, 1996), obtendo-se o resultado de: área lateral =  $2 \times 3,14 \times 1,25 \times 10 = 78,5 \text{ cm}^2$  sendo que em 1 mL a área seria  $7,85 \text{ cm}^2$ , portanto a proporção de 0,127 mL da amostra na diluição em água peptonada para a área de  $1 \text{ cm}^2$ . Os suabes acondicionados em água peptonada a 0,1% foram transportados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e levados ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

#### **4.2.6. Amostras dos queijos**

De cada amostra foram pesados assepticamente 25 gramas do produto e homogeneizadas utilizando um Stomacher com 225 mL de água peptonada estéril 0,1% por no mínimo dois minutos a fim de obter a diluição original ( $10^{-1}$ ). Posteriormente foi efetuada a diluição da amostra até  $10^{-3}$  (APHA, 2001).

### **4.3. Exames laboratoriais**

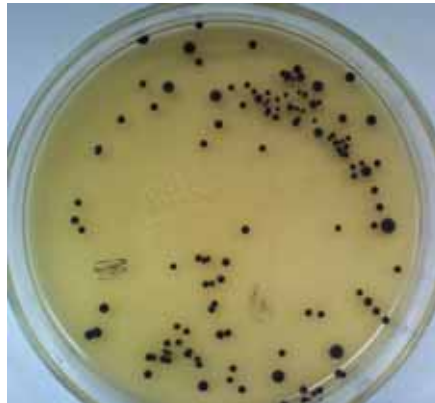
#### **4.3.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase positivos**

Todas as amostras foram semeadas em ágar *Baird-Parker* com os suabes utilizados nas colheitas e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. A seguir, três a cinco colônias características foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-positivos e agrupados sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoina. (Mac FADDIN, 1976).

#### **4.3.2. Contagem em placa das colônias sugestivas de estafilococos isolados do queijo.**

Para as amostras de queijo previamente diluídas foram semeados 0,1mL sobre a superfície de placas de Petri com Agar de *Baird-Parker* (BP), em seguida, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalski e

posteriormente incubadas à temperatura de 35°C por 24 e 48 horas. Os números de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente à placa de contagem, obtendo-se assim o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus* spp. (SILVA et al., 2007).



**Figura 2.** Exemplo de colônias sugestivas de estafilococos em meio *Baird-Parker* isoladas do leite cru de micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

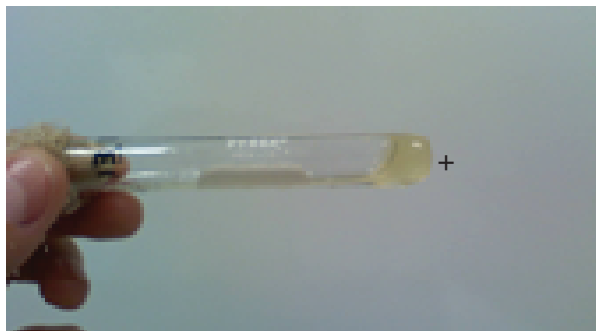
#### **4.3.3. Teste da catalase**

Após 24 h de cultivo em ágar nutriente, com uma alça bacteriológica flambada, retirou-se uma determinada quantidade do isolado. Logo após foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionando-se uma gota de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% sobre os micro-organismos na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas (Mac FADDIN, 1976).

#### **4.3.4. Teste da coagulase livre em tubo**

Para a execução da prova de coagulase, as culturas foram semeadas em tubos contendo caldo de infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* - BHI), e incubadas a 35°C por 24 horas. Em sequência acrescentaram-se, em tubos de ensaio (10 x 70 mm), 0,3 mL desta cultura e 0,5 mL de plasma de coelho diluído a 1:5 em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada. Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C e as leituras realizadas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas. O

resultado foi considerado positivo quando ocorria coagulação do plasma (GARCIA et al.,1980). Apesar da possibilidade, segundo SOUTO (2006), de isolados de *S. aureus* de infecções intramamárias apresentarem características bioquímicas atípicas, não demonstrando comportamento bioquímico clássico, como por exemplo, a reação de coagulase positivo, no presente trabalho, os micro-organismos isolados que não foram positivos ao teste da coagulase não foram submetidos às demais provas de identificação para *S. aureus*.



**Figura 3.** Teste da coagulase livre em tubo de estirpe de *Staphylococcus aureus* isolado do Queijo Tipo Minas Frescal de micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

#### 4.3.5. Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoína a partir da glicose, as culturas foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP (*Methyl red Voges-Proskauer Broth*) e incubadas a 37 °C por 48 h. Em seguida, foi adicionada 0,6 mL de uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de *Barrit*) em cada tubo. Após agitação foram considerados positivos os tubos em que a cultura apresentou a coloração vermelha decorridos 15 minutos (Mac FADDIN, 1976).

#### 4.3.6. Análise das amostras de água

As amostras foram diluídas até  $10^{-3}$  e submetidas à técnica de membrana filtrante (membrana *Schleicher e Schuell* de 0,45  $\mu$  e 47 mm de diâmetro, ref. nº 1794-0) em sistema de filtro acoplado em kitassato conectado à bomba de vácuo. Inicialmente

foram filtrados 10 mL da amostra diluída e posteriormente 10 mL da amostra sem diluição. Entre cada amostra foram filtrados 100 mL de água destilada estéril (APHA, 2001). Para cada amostra foi utilizada uma membrana, a qual foi colocada em placa de Petri contendo ágar *Baird-Parker*. As colônias suspeitas foram avaliadas segundo suas características morfológicas e tintoriais (Mac FADDIN, 1976).

#### **4.4. Caracterização molecular dos isolados**

A caracterização molecular dos isolados foi realizada em todas as estirpes que se apresentaram como cocos Gram-positivos, agrupados sob a forma de “cachos de uva” e que se mostraram positivas nos testes da catalase, da coagulase e de *Voges-Proskauer*.

##### **4.4.1. Extração de DNA**

Para a extração de DNA das estirpes isoladas utilizou-se o Kit Invitex®, – Extração de Material Genômico, que continha o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas de purificação. Foi centrifugado 1,5 mL de cultura em caldo BHI (37°C/18h a 24h) a 10.000 rpm por 3 min e 30 s. Em seguida, todo o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito de sódio. O precipitado foi ressuscitado em 400 µL de Tampão de Ressuspensão R, transferido para o Tubo de Extração L e incubado a 37°C por 10 min, em constante agitação. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 min e por fim incubadas a 95°C por 5–10 min em constante agitação. Para manter as amostras sobre agitação constante utilizou-se o equipamento Thermomixer Compact. Foi adicionado às amostras 400 µL de Tampão de Ligação B6, homogeneizou-se e em seguida todo o conteúdo do Tubo de Extração L foi transferido para o RTA - Coluna com Filtro, incubadas a temperatura ambiente por 1 min e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min e 30 s, com posterior descarte do filtrado. Ao RTA Coluna com Filtro foi adicionado 500 µL de Tampão de Lavagem I. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 min e 30 s. Os filtrados foram descartados juntamente com os tubos, sendo que o RTA - Coluna com Filtro foi colocado em novos tubos RTA -



Receptor. Ao RTA - Coluna com Filtro foi adicionado 600 µL de Tampão de Lavagem II e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 min e 30 s. Após o descarte do filtrado, as amostras foram novamente centrifugadas para prover total eliminação do Tampão de Lavagem II, a 13.200 rpm por 3 min e 30 s, sendo os filtrados descartados juntamente com os tubos. O RTA - Coluna com Filtro foi colocado em RTA Receptor de 1,5 mL. Ao RTA - Coluna com Filtro foi adicionado 200 µL do Tampão de Eluição D, previamente aquecido a 56°C. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 min, e em seguida, centrifugadas a 8.000 rpm por 1 min e 30 s. Os filtrados que continham o material genético desejado, foram armazenados em freezer - 20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

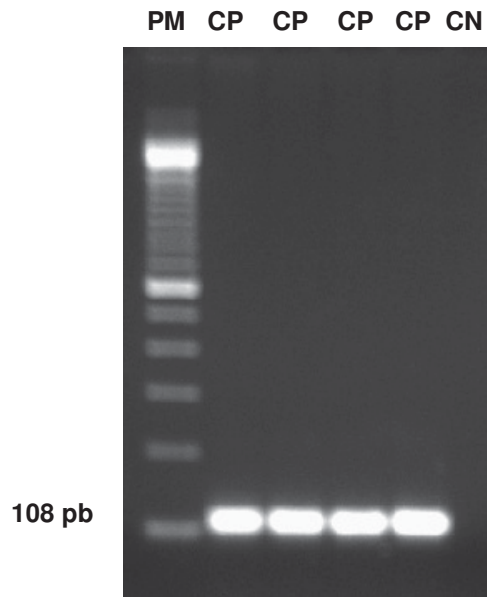
#### **4.4.2. Amplificação de fragmentos de DNA para identificação do *Staphylococcus aureus***

A caracterização molecular dos *S. aureus* foi efetuada a partir da amplificação de fragmento de DNA genômico específico para este micro-organismo (*primer* Sa442), utilizando o protocolo descrito por MARTINEAU et al. (1998) modificado no presente estudo não utilizando-se do *primer* universal 16S rRNA, utilizado pelo autor apenas como controle interno de identificação universal de bactérias. Desse modo, apenas as estirpes identificadas genotipicamente pela utilização do *primer* Sa442 como sendo *S. aureus* foram submetidas aos testes seguintes. As reações compreenderam volume final de 20 µL contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada *dNTP*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 1) Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*. As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por três minutos, a 94°C e, posteriormente, a 30 ciclos de um segundo, a 95°C, para desnaturação e 30 segundos, a 55°C, para pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, em cuba horizontal. Sendo assim, 10 µL do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo a uma concentração de 50 µL/L e submetido à corrida

eletroforética a 120 V por 90 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen, Brasil), disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese, como padrão para o tamanho das bandas de DNA formadas. O tamanho do fragmento esperado amplificado foi de 108pb. O produto de eletroforese foi visualizado em aparelho fotodocumentador Gel Doc 2000 – BioRad. Foram tomados os devidos cuidados para evitar-se a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório com o material genético. As amostras foram extraídas, amplificadas e visualizadas na mesma sequência. A inclusão de um controle negativo (água Mili-Q estéril e filtrada) foi realizada durante todo o procedimento para prevenir riscos de resultados falsos positivos em todas as reações. Foi utilizada a ATCC 25923 como cepa controle positiva de *S. aureus* em todas as reações (Figura 4).

**Quadro 1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Brasil) utilizados para identificação da espécie de *Staphylococcus aureus* e o tamanho do fragmento esperado.

Primers	Sequência	Tamanho do fragmento esperado - pares de bases
<i>Sa442-1</i>	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG-3'	108 pb
<i>Sa442-2</i>	5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATAACA-3'	



**Figura 4.** Eletroforograma da ATCC 25923, utilizada como cepa controle positivo nas análises moleculares para confirmação da espécie *Staphylococcus aureus*.  
 PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®);  
 C.P.: Controle positivo (utilização de DNA da ATCC 25923);  
 C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada).

#### 4.5. Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE*)

De acordo com o protocolo estabelecido por McDOUGAL et al. (2003), uma alçada das amostras de cultura pura de *S. aureus* estocadas em BHI e mantidas sob refrigeração foram semeadas em 5 mL de caldo THB (*Todd-Hewitt Broth*) e incubadas sob agitação vigorosa a 35 - 37°C por 18 - 24 h. O ajuste da concentração bacteriana foi feito em espectrofotômetro com a adição de salina e absorbância de 0,9 a 1,1 com comprimento de onda de 610 nm. Duzentos microlitros da suspensão bacteriana foram centrifugados a 12.000 rpm por dois a quatro minutos e o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspendido em 300 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e equilibrado em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Foram utilizados, para a lise celular, 40 µL de solução de lisostafina (1 mg/mL em 20 mM de acetato de sódio) e, acrescidos à suspensão bacteriana, 300µL de solução 20% de

agarose low-melting (em tampão TE), gentilmente homogeneizados e dispostos nos moldes para a confecção dos blocos. A solidificação da mistura foi realizada em temperatura ambiente por 10 minutos ou em refrigerador a 4°C por cinco minutos. Em seguida, os blocos foram removidos dos moldes e adicionados em tubos contendo 3 mL de tampão de lise EC (6 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de lauroylsarcosine, pH 8,0) e incubados a 37°C por, no mínimo, 4 horas.

Posteriormente, o tampão de lise EC foi descartado e adicionados 4 mL de tampão TE, incubando a 37°C por 30 minutos, e esta troca repetida, no mínimo, mais três vezes até posterior utilização para a digestão restritiva com enzima *Sma*I, que cliva o DNA no local de restrição CCC-GGG. Os blocos foram armazenados a 4°C. Para a digestão restritiva com *Sma*I, foi transferido um bloco para novo tubo de ensaio com 200 µL de tampão de restrição 1x, para equilíbrio do bloco, e incubados a 30°C por, pelo menos, 30 minutos. Após a remoção deste tampão, foram acrescentados 200 µL de reação, desta vez com 5 µL da enzima *Sma*I, em cada tubo, com incubação a 30°C por 4 horas. Após a solidificação do gel de agarose (BioRad) a 1% preparado em tampão 0,5 x TBE, os blocos foram introduzidos diretamente nos poços formados com a retirada do pente que acompanha o aparelho. Para a vedação, foi utilizada a mesma agarose equilibrada a, aproximadamente, 56°C, com a finalidade de impedir que os blocos saíssem dos poços. A eletroforese foi executada com célula de eletroforese CHEF-DR III (BioRad, Melville, N. Y.) e, como padrão, foi utilizado DNA do bacteriófago λ, que serviu como controle dos parâmetros de corrida das unidades CHEF-DR. Os padrões de corrida foram os seguintes: pulso inicial, 5 segundos; pulso final, 40 segundos; voltagem, 200 V ou 6 V/cm; tempo, 21 horas; e temperatura a 14°C. Para que os fragmentos de DNA fossem corados, os géis foram colocados, sob imersão, em 100 µL de tampão TE com 1,5 µL de brometo de etídio, por 45 minutos. Em seguida foram descorados em água destilada, por 25 minutos e fotografados posteriormente para a visualização dos diferentes pulsotipos no sistema de fotodocumentação GelDoc® (BioRad).

#### 4.6. Classificação dos pulsotipos

A classificação dos pulsotipos em grupos foi gerada pelo dendrograma resultante da análise de agrupamento por método hierárquico utilizando como medida de semelhança entre os pulsotipos, o coeficiente de Jaccard e a ligação dos grupos utilizando o método de WARD, que é um método de variância, derivado de um processo hierárquico e aglomerativo (HAIR et al., 2005). O software STATISTICA versão 7 foi utilizado no processamento da análise de agrupamento. As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, UNESP.

#### 4.7. Amplificação dos genes codificadores das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1

Foram utilizados os DNAs extraídos e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  das estirpes geneticamente comprovadas como *S. aureus* para pesquisar a presença de genes codificadores das enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e da toxina da síndrome do choque tóxico TSST-1 (*tst*) através da amplificação de suas sequências codificadoras. Segundo protocolo estabelecido por CUNHA et al. (2007), as reações compreenderam volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2) (JOHNSON et al., 1991) Sea-1 (5'- TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA) e Sea-2 (5'- GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA); Seb-1 (5'- TCG CAT CAA ACT GAC AAA C) e Seb-2 (5'- GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC); Sec-1 (5'- GAC ATA AAA GCT AGG AATTT) e Sec-2 (5'- AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC); Sed-1 (5'- CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT) e Sed-2 (5'- TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG); Tst-1 (5'- ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA) e Tst-2 (5'- TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT), 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start* e utilizados 5  $\mu\text{L}$  de DNA de cada estirpe identificada genotipicamente como pertencente à espécie *S. aureus*.

As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por quatro minutos, à desnaturação a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por dois minutos, pareamento a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um minuto e 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um minuto e 30

segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por dois minutos, pareamento a 53 °C por um minuto e 30 segundos e extensão a 72 °C a um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de pareamento foi reduzida a 51 °C, seguido por mais 37 ciclos a 94 °C por dois minutos, 51 °C por um minuto e 30 segundos e 72 °C por um minuto e 30 segundos. No final dos 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por sete minutos e a 4 °C até o momento de retirada do termociclador.

Assim, 10 µL do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo a uma concentração de 50 µL/L e submetido à corrida eletroforética a 150 V por uma hora e 30 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen, Brasil), disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese, como padrão para o tamanho das bandas de DNA formadas. O produto de eletroforese foi visualizado em aparelho fotodocumentador Gel Doc 2000 – BioRad. Foram tomados os devidos cuidados para evitar-se a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório com o material genético. As amostras foram extraídas, amplificadas e visualizadas na mesma sequência. A inclusão de um controle negativo (água Mili-Q estéril e filtrada) foi realizada durante todo o procedimento para prevenir riscos de resultados falsos positivos em todas as reações.

**Quadro 2.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Brasil) utilizados para identificação das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico, TSST-1 e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.

Primers	Sequência	Tamanho do fragmento esperado - pares de bases
<i>Sea-1</i>	5'-TTGGAAACGGTTAAAACGAA-3'	120 pb
<i>Sea-2</i>	5'-GAACCTTCCCATCAAAAACA-3'	
<i>Seb-1</i>	5'-TCGCATCAAACCTGACAAAC-3'	478 pb
<i>Seb-2</i>	5'-GCAGGTACTCTATAAGTGCC-3'	
<i>Sec-1</i>	5'-GACATAAAAGCTAGGAATTT-3'	257 pb
<i>Sec-2</i>	5'-AAATCGGATTAACATTATCC-3'	
<i>Sed-1</i>	5'-CTAGTTTGGTAATATCTCCT-3'	317 pb
<i>Sed-2</i>	5'-TAATGCTATATCTTATAGGG-3'	
<i>Tsst-1</i>	5'-ATGGCAGCATCAGCTTGATA-3'	350 pb
<i>Tsst-2</i>	5'-TTTCCAATAACCCCGTTT-3'	

#### 4.8. Determinação do potencial toxigênico de estirpes de *Staphylococcus aureus*

As amostras de *S. aureus* identificados pela PCR como portadores de genes codificadores de enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e a TSST-1 (*tsst*) foram enviadas para a equipe do Dr. Ricardo Souza Dias, do Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte - MG, para que fossem analisadas e confirmadas por intermédio da imunodifusão, a partir da utilização do método de placa de sensibilidade ótima (OSP, *optimum-sensitivity plate method*), descrito por ROBBINS et al. (1974). Após colocação da membrana de diálise sobre placas de ágar infusão cérebro-coração contendo 1% de extrato de levedura, foram acrescentados 100 µL de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e sua superfície, contendo toxinas e bactérias, foi lavada com 1,5 mL de PBS com pH 7,4. As bactérias foram removidas por centrifugação a 14.000 rpm e 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para frascos de vidro e utilizado no teste de imunodifusão. As placas de imunodifusão foram preenchidas com 3,0 mL de solução de agarose em concentração de 1,2% em PBS pH 7,4 com 0,01% de timerosal. Os poços

foram feitos de acordo com o modelo do *Food Research Institute*. Para cada toxina a ser analisada, foram utilizados soros específicos na cavidade central, enquanto as amostras-teste foram adicionadas nos poços ao redor, todos em volume equivalente a 25  $\mu\text{L}$ . Após incubação em câmara úmida a 37°C, por 24 horas, as placas foram analisadas quanto à presença de linhas de precipitação e com identidade com os padrões.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase positivos de acordo com pontos de colheita das amostras

Das 140 amostras colhidas nos diversos pontos do processo de elaboração do Queijo Tipo Minas Frescal, foram isoladas e identificadas 74 (52,8%) estirpes de estafilococos coagulase positivos (Tabela 1) posteriormente submetidas à amplificação de fragmentos de DNA específico da espécie de *S. aureus*.

**Tabela 1.** Distribuição das 74 estirpes de estafilococos coagulase positivos de acordo com os pontos de colheita das 140 amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

Pontos de colheita das amostras	n° de amostras	% do total de amostras	% do total de isolados
Mãos do Manipulador	11	7,8	14,9
Leite cru do tanque de recepção	11	7,8	14,9
Queijo embalado para comercialização	10	7,1	13,5
Superfície interna do tanque de recepção	7	5,0	9,4
Superfície interna do tanque de estocagem	7	5,0	9,4
Leite cru do tanque de estocagem	7	5,0	9,4
Leite pasteurizado	5	3,6	6,7
Superfície da mesa do queijo	4	2,8	5,4
Superfície interna do latão de leite	4	2,8	5,4
Superfície interna do tanque de equilíbrio	3	2,1	4,0
Superfície interna do tamber	2	1,4	2,7
Superfície da Lira	2	1,4	2,7
Tubulação de saída do pasteurizador	1	0,7	1,3
<b>TOTAL</b>	<b>74</b>	<b>52,8</b>	<b>100</b>

ZAFALON et al. (2009), verificaram em pesquisa no ambiente de ordenha, que das 245 estirpes isoladas de diversos pontos, 150 (61%) isolados do leite foram positivos ao *S. aureus*, destacando-se a importância deste patógeno na diminuição da

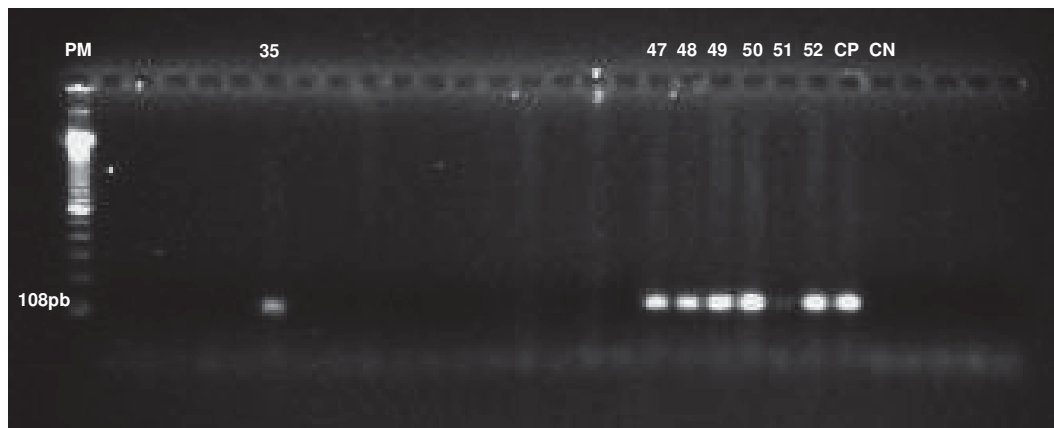
qualidade da matéria prima. No presente estudo o leite também obteve destaque da presença de estafilococos coagulase positivos em 18 (24,3%) de 74 isolamentos.

Pode-se observar que a mão do manipulador obteve 11 (15%) do total dos 74 isolamentos, mas 92% se considerarmos apenas o ponto de colheita. É importante destacar que o manipulador utilizava luvas, mas para conseguir verificar o “ponto” do queijo as retirava e mergulhava a mão e parte do antebraço dentro do tamber, pois com a luva “perdia a sensibilidade para verificar se a massa do queijo estava pronta”.

## 5.2. Amplificação de fragmentos de DNA genômico para identificação do *Staphylococcus aureus*

Entre as 74 estirpes de estafilococos coagulase-positivos, o fragmento de DNA genômico específico da espécie de *S. aureus* foi amplificado em 41 (55,4%) amostras. Os produtos da reação de amplificação de algumas amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de *S. aureus* estão apresentados na Figura 5.

A distribuição das estirpes de *S. aureus* isoladas de acordo com os pontos de colheita das amostras na micro-usina está apresentada na Tabela 2.



**Figura 5.** Eletroforograma gerado de amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de *Staphylococcus aureus*.

PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®)

C.P.: Controle positivo (utilização de DNA da ATCC 25923)

C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada).

Na Tabela 2, observa-se que as estirpes de *S. aureus* obtidas das mãos do manipulador (19,5%), seguido do leite cru do tanque de recepção (14,6%), da superfície interna do tanque de estocagem (12,2%) e o leite cru do tanque de estocagem (12,2%), foram os pontos de colheita que apresentaram o maior número de isolados.

**Tabela 2.** Distribuição das 41 estirpes de *Staphylococcus aureus* confirmadas pela PCR de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

Pontos de colheita de amostras	n° de amostras	%
Mãos do Manipulador	8	19,5
Leite cru do tanque de recepção	6	14,6
Superfície interna do tanque de estocagem	5	12,2
Leite cru do tanque de estocagem	5	12,2
Superfície interna do tanque de recepção	3	7,3
Superfície interna do latão de leite	3	7,3
Superfície interna do tanque de equilíbrio	3	7,3
Leite pasteurizado para elaboração do queijo	3	7,3
Queijo embalado para comercialização	3	7,3
Superfície da mesa do queijo	1	2,5
Superfície da Lira	1	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>100%</b>

Deve-se considerar, observando os dados do leite cru e sendo o *S. aureus* um dos principais agentes da mastite subclínica, que a qualidade do leite entregue pelos 21 produtores que abastecem a micro-usina de matéria prima deve ser monitorada.

MEDEIROS & SOUZA (2008) isolaram 127 (30%) estirpes de *S. aureus* em 14 propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP, principalmente de quartos com mastite subclínica. FERREIRA (2008) ao estudar 245 estirpes de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite e de outros sítios de localização em uma propriedade rural, observou que os isolamentos foram mais frequentes entre amostras de leite.

A presença do *S. aureus* em amostras da superfície interna de latões e de tanques de recepção, estocagem e equilíbrio pode ser atribuída às precárias condições

higiênicas destes latões e da provável ocorrência de falhas nos procedimentos de higienização dos tanques.

Considerando-se a capacidade de estirpes de *S. aureus* formarem biofilmes e aderirem a diversas superfícies, principalmente de equipamentos e tubulações, ressalta-se a importância da sanitização e da higiene adequada destes equipamentos para a eliminação desses agentes (SANTOS, 2009). Neste estudo a presença de *S. aureus* no leite pasteurizado pode ser explicada pela situação precária da tubulação entre o pasteurizador e o tanque de equilíbrio (Figura 1) podendo-se destacar novamente a possível formação de biofilmes. Observou-se a necessidade de um monitoramento das condições dos equipamentos utilizados no fluxograma do queijo com melhorias no processo de higienização e a troca de tubulações danificadas.

A detecção do *S. aureus* em queijos elaborados com leite pasteurizado, como no presente estudo (Tabela 2) também pode ser fruto de sua contaminação posterior, lembrando que o tratamento térmico é eficiente em eliminar células viáveis dessas bactérias (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989). Observa-se na Tabela 2 que houve um maior isolamento de estirpes de *S. aureus* das mãos dos manipuladores (19,5%). ASSUMPÇÃO et al. (2003) enfatizaram que a manipulação incorreta dos alimentos pode causar contaminação posterior, mesmo após o produto ser submetido a tratamento térmico. Os dados obtidos sobre a incidência de *S. aureus* em queijo prato mostraram que a população de estafilococos coagulase positivos verificada nas mãos e antebraços de manipuladores seria a fonte de recontaminação do queijo analisado.

Sabendo-se que as mãos constituem uma importante fonte de infecção pós-pasteurização durante o processamento do Queijo Tipo Minas Frescal, os resultados do presente estudo demonstram a importância da frequente higienização das mãos e a utilização de luvas durante todo o processamento.

Alguns autores isolaram o *S. aureus* em amostras de Queijo Tipo Minas Frescal como demonstrado no estudo realizado por ALMEIDA FILHO & NADER FILHO (2000) em 80 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal comercializadas na cidade de Poços de Caldas – MG, 40 (50,0%) apresentaram populações de *S. aureus* acima do limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde para o Queijo Tipo Minas Frescal produzido

industrialmente. WENDPAP & ROSA (1993) estudando o Queijo Tipo Minas Frescal consumido na cidade de Cuiabá – MT, detectaram *S. aureus* em 40% das amostras analisadas apresentando populações acima de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. Na análise de 10 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal comercializados em feiras na Região de São José do Rio Preto - SP, HOFFMAN et al. (2002) constataram todas fora do padrão permitido para *S. aureus*.

Diferente dos resultados dos trabalhos supracitados, no presente estudo as contagens das colônias de *S. aureus* nas placas de BP dos queijos estudados obtiveram a média de  $2.10^{-1}$  UFC.g<sup>-1</sup>. Resultado dentro do recomendado pela legislação, mas deve-se considerar que este queijo acabara de ser embalado para comercialização e que durante sua vida de prateleira poderá atingir níveis inaceitáveis pela multiplicação do patógeno, tornando-se um risco potencial para a saúde do consumidor.

Observa-se também neste estudo que não houve isolamento de estirpes de *S. aureus* na água utilizada na higienização dos equipamentos e na elaboração do queijo. Isto se deve possivelmente pelo constante monitoramento da qualidade microbiológica da água advinda do poço sem-artesiano utilizado e sua cloração. Estes dados diferem de AMARAL et al. (2003), que isolaram o *S. aureus* em água de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, demonstrando a importância do cuidado com a qualidade da água utilizada para consumo, higienização e elaboração de produtos.

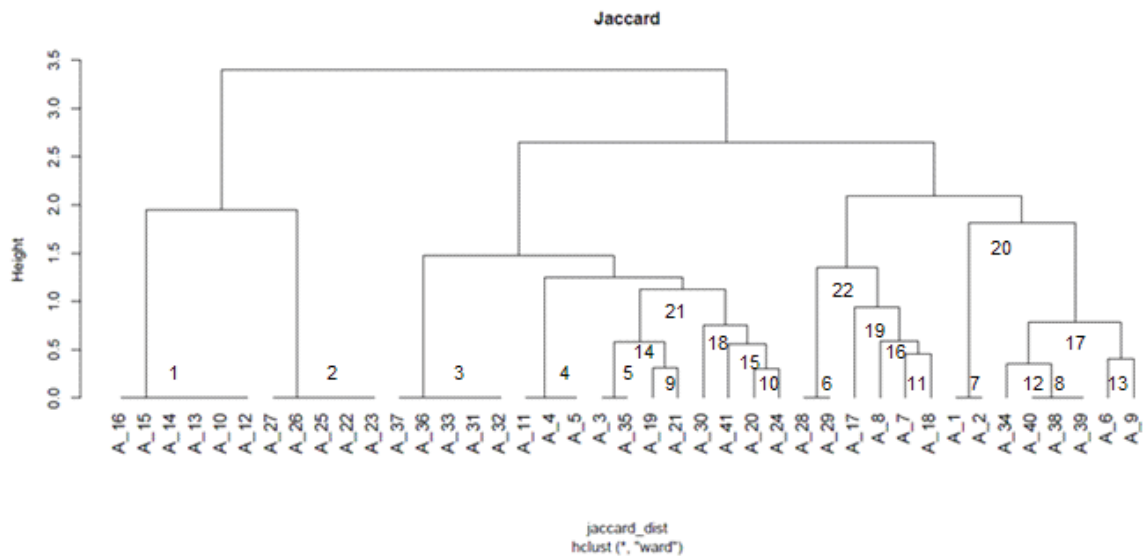
### 5.3. Eletroforese em gel de campo pulsado

Foram 41 estirpes de *S. aureus* submetidas à PFGE, cujos produtos amplificados obtidos, estão apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Padrões de restrição do DNA genômico das estirpes de *Staphylococcus aureus*, submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.

De acordo com o método de análise de agrupamento utilizado foi possível classificar as estirpes de *S. aureus* analisadas em 22 pulsotipos (Figura 7). A classificação dos pulsotipos foi realizada pela análise do dendrograma de acordo com o estabelecido por TENOVER et al. (1997), os quais estabelecem que as amostras com até 70% de similaridade são agrupadas como mesmo pulsotipo.



**Figura 7.** Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais do DNA de *Staphylococcus aureus* em PFGE.

A Tabela 3 demonstra os padrões de identificação de *S. aureus* isolados nos pontos de colheita da micro-usina. De acordo com os dados, no presente estudo observou-se heterogeneidade genética entre os isolados, uma vez que foi observado 22 diferentes pulsotipos em 41 amostras. Durante a pesquisa bibliográfica não foram encontrados trabalhos de padrões de restrição do DNA de estirpes de *S. aureus* submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de isolados de micro-usina ou laticínios, o que demonstra a importância epidemiológica e a continuidade desta linha de pesquisa.

**Tabela 3.** Padrões de restrição do DNA genômico das 41 estirpes de *Staphylococcus aureus* submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

		*Pontos de Colheita da Amostras										
		SILL	SITR	LCTR	SITE	LCTE	SITEQ	LP	SL	SMQ	MM	Q
Pulsotipos / Total -%		n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
1	6 - 14,6%		1	3		2						
2	5 - 12,2%		1	1	1	1	1					
3	5 - 12,2%	1					1	3				
4	3 - 7,3%		1		1	1						
5	4 - 9,7%	1			1				1			1
6	2 - 4,9%						1			1		
7	2 - 4,9%			2								
8	3 - 7,3%										2	1
9	2 - 4,9%								1			1
10	2 - 4,9%				1							1
11	2 - 4,9%										2	
12	4 - 9,7%	1									2	1
13	2 - 4,9%					1					1	
14	4 - 9,7%	1			1						1	1
15	4 - 9,7%				1						1	1
16	3 - 7,3%										3	
17	6 - 14,6%	1				1					3	1
18	4 - 9,7%				2						1	1
19	4 - 9,7%										4	
20	8 - 19,5%	1		2		1					3	1
21	8 - 19,5%	1			3				1		1	2
22	6 - 14,6%						1			1	4	

\***SILL** - SUPERFÍCIE INTERNA LATÃO DE LEITE / **SITR** – SUPERFÍCIE INTERNA TANQUE RECEPÇÃO / **LCTR** - LEITE CRU DO TANQUE DE RECEPÇÃO / **SITE** - SUPERFÍCIE INTERNA DO TANQUE DE ESTOCAGEM / **LCTE** - LEITE CRU DO TANQUE DE ESTOCAGEM / **SITEQ** - SUPERFÍCIE INTERNA DO TANQUE DE EQUILÍBRIO / **LP** - LEITE PASTEURIZADO / **SL** - SUPERFÍCIE DA LIRA / **SMQ** – SUPERFÍCIE DA MESA DO QUEIJO / **MM** – MÃOS DO MANIPULADOR / **Q** – QUEIJO.



Alguns trabalhos utilizando-se a PFGE foram realizados em ambiente de ordenha e na avaliação da qualidade do leite. FERREIRA (2008) obteve 39 pulsotipos, das 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, em trabalho realizado em Nova Odessa - SP. Em trabalho realizado em onze rebanhos nos Estados de São Paulo e Pernambuco por SANTOS (2009) identificou-se 32 perfis genéticos a partir dos 107 isolados de leite, material de insufladores, pele do úbere, mãos e fossas nasais de ordenhadores. SOUZA (2010) encontrou heterogeneidade genética entre 103 estirpes de *S. aureus* isoladas, uma vez que foram identificados 32 pulsotipos diferentes em pontos do fluxograma de produção do leite de 16 propriedades diferentes de Sacramento – MG.

Neste estudo verificou-se a manutenção e a disseminação clonal de alguns pulsotipos identificados nas amostras analisadas. Pode-se observar que do pulsotipo 1 ao 8 as estirpes possuem 100% de similaridade (Figura 7). Conforme apresentado na Tabela 3, os pulsotipos 20 e 21 apresentaram a maior prevalência entre os pulsotipos encontrados, com 19,5% (8) das estirpes tipadas, seguidos pelos padrões 1, 17 e 22 com 14,6% (6) e dos pulsotipos 2 e 3 com 12,2% (5). A ocorrência de estirpes de *S. aureus* do mesmo pulsotipo nos diferentes pontos do processamento do Queijo Tipo Minas Frescal evidenciou, portanto, a disseminação do agente entre os diferentes pontos da micro-usina estudados e a relação epidemiológica existente entre as fontes de infecção e vias de transmissão.

A distribuição do pulsotipo 20 das estirpes de *S. aureus* foi observada em isolados da superfície interna do latão de leite (1), do leite cru do tanque de recepção (2), leite cru do tanque de estoque (1), das mãos do manipulador (3) e do queijo pronto para consumo (1). Com relação ao pulsotipo 21 sua maior distribuição das estirpes de *S. aureus* foi observada em isolados da superfície interna do latão de leite (1), do leite cru do tanque de recepção (1), da superfície interna do tanque de estocagem (3), das mãos do manipulador (1) e do queijo pronto para consumo (2).

É importante ressaltar a presença das mãos do manipulador (59%) e do queijo (50%) nos 22 pulsotipos encontrados.

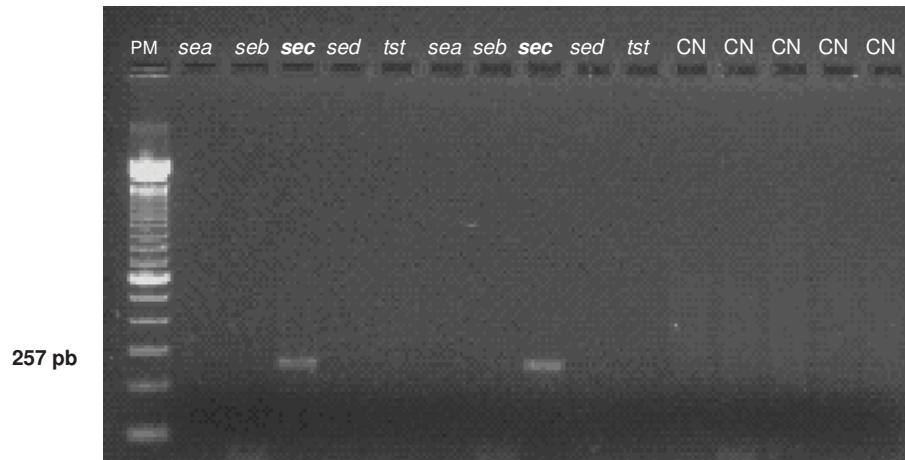
Com os resultados do presente estudo evidencia-se a importância desses pontos no mecanismo de transmissão do agente durante o processamento do Queijo Tipo Minas Frescal inclusive pós-pasteurização, sugerindo ainda, o papel importante dos cuidados com a higienização das mãos do manipulador durante todo o processo, a utilização de luvas, a qualidade da matéria prima, o controle da temperatura do pasteurizador e a desinfecção dos utensílios e dos equipamentos da micro-usina objeto desta investigação.

Deve-se ressaltar que a presença de estirpes do mesmo pulsotipo em pontos anteriores e posteriores à pasteurização evidencia falha neste processamento ou contaminação pós-pasteurização, mas sem relação com o processo térmico. O fluxograma de elaboração do queijo deve ser separado dentro da micro-usina em pré-pasteurização e pós-pasteurização, bem como a importante decisão de que o manipulador responsável pela elaboração do Queijo Tipo Minas Frescal, além dos cuidados de higienização citados anteriormente, exerça apenas a sua função, não circulando na área pré-pasteurização, controlando assim a disseminação dos pulsotipos encontrados nesta área e a contaminação do produto final.

#### **5.4. Amplificação de fragmentos de DNA genômico dos genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED e da toxina TSST-1.**

Entre as 41 estirpes de *S. aureus* foram amplificados o DNA específico dos genes codificadores das enterotoxinas A, B, C, D e da toxina TSST – 1 em 25 (61%) das estirpes (Figura 8).

As distribuições das estirpes de *S. aureus* positivas para algum gene codificador das toxinas estudadas e de acordo com a origem das amostras estão apresentadas na Tabela 4.



**Figura 8.** Produto da reação de amplificação de algumas amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de *Staphylococcus aureus* com os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*  
 PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®)  
 C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada)

Com relação aos resultados da presença dos genes codificadores das enterotoxinas e toxina TSST-1 em 25 amostras, pode-se observar na Tabela 4 a positividade de 15 amostras somente para o gene *sea* (60%), duas amostras com positividade para o gene *seb* (8%), quatro amostras com positividade para o gene *sec* (16%), uma amostra apresentando positividade para os genes *sea* e *sec* (4%), uma amostra apresentando positividade para os genes *seb* e *sec* (4%), uma amostra apresentando positividade para os genes *sea* e *seb* (4%) e uma amostra apresentando positividade para os genes da enterotoxina *sea* e da toxina *tst* (4%).

**Tabela 4.** Distribuição das 25 estirpes de *Staphylococcus aureus* com a presença de genes codificadores de toxinas confirmados pela PCR de acordo com os pontos de colheita das amostras em uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, 2008/2009.

Pontos de colheita de amostras	n° de amostras (gene codificador)	%
Mãos do Manipulador	4 ( <i>sea/seb;seb;sea;sec</i> )	16,0
Superfície interna do latão de leite	3 ( <i>sea;sea;sea</i> )	12,0
Queijo embalado para comercialização	3 ( <i>sea/tst; sea;sec</i> )	12,0
Leite pasteurizado para elaboração do queijo	3 ( <i>seb/sec;sea;sea</i> )	12,0
Leite cru do tanque de recepção	3 ( <i>sec;seb;sea</i> )	12,0
Superfície interna do tanque de estocagem	3 ( <i>sea/sec;sec;sea</i> )	12,0
Leite cru do tanque de estocagem	2 ( <i>sea;sea</i> )	8,0
Superfície interna do tanque de equilíbrio	2 ( <i>sea;sea</i> )	8,0
Superfície interna do tanque de recepção	1 ( <i>sea</i> )	4,0
Superfície da Lira	1 ( <i>sea</i> )	4,0
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>100%</b>

A detecção do gene da enterotoxina A em linhagens de *S. aureus* é importante visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). SCHERRER et al. (2004) verificaram, em leite de cabras obtido de tanques de expansão, a presença do gene *sea* em 28 (14,6%) estirpes de *S. aureus* isolados.

ZAFALON et al. (2009) encontraram a prevalência do gene *sea* no leite das vacas com mastite em estudo do ambiente de ordenha prevalecendo em duas estações climáticas estudadas, chuvosa e seca (35% / 57%). Diferente dos resultados de SILVA

et al. (2005) que encontrou em estudo realizado com rebanho bovino no Brasil, 4 (6,3%) amostras positivas para o gene *sea* nos 64 isolados de leite mastítico.

Os pontos de colheita que apresentaram maior frequência de isolamento de estirpes de *S. aureus* com a presença de genes codificadores de enterotoxinas foram: as mãos do manipulador (16,0%), superfície interna do latão de leite (12%), o leite cru do tanque de recepção (12,0%), a superfície do tanque de estocagem (12,0%), o leite pasteurizado para elaboração do queijo (12,0%) e o Queijo Tipo Minas Frescal pronto para consumo (12,0%).

A presença de estirpes toxigênicas de *S. aureus* no leite e no queijo não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, pois pequenas concentrações de toxinas são suficientes para causar doença em seres humanos, principalmente em crianças e idosos (CARDOSO et al., 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Em estudos realizados por REALI (1982) e MEYRAND et al. (1998) foram documentados abundantes casos de intoxicação estafilocócica por consumo de alguns leite e queijos, respectivamente.

No presente estudo pode-se verificar a presença de estirpes de *S. aureus* toxigênicos tanto em superfícies, como em leite cru, pasteurizado e no queijo pronto para o consumo. Tais achados sugerem a provável contaminação do leite por possíveis fragmentos de biofilme liberados no produto durante a sua circulação ao longo do fluxograma de beneficiamento do leite. Acredita-se também que nos micro orifícios encontrados em parte da tubulação pós-pasteurização haja adesão bacteriana com formação de biofilme contaminando o leite e seus derivados elaborados nesta micro-usina. A presença de estirpes de *S. aureus* toxigênicas pode ter importante significado epidemiológico na ocorrência de intoxicação alimentar, mesmo estando dentro dos padrões esperados de UFC.g<sup>-1</sup>. A simples presença destas bactérias no queijo logo após sua elaboração sugere que durante sua a vida de prateleira o número de *S. aureus* pode chegar a níveis perigosos para o consumo.

SANTOS & GENIGEORGIS (1981), estudaram a capacidade de o *S. aureus* sobreviver, multiplicar e produzir enterotoxinas no Queijo Tipo Minas Frescal. Populações de *S. aureus* maiores que 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> foram observadas em 57 (44%) dos

queijos elaborados com leite pasteurizado e detectadas as enterotoxinas do tipo A, B e C em 10 das 16 estirpes isoladas estudadas. MANDIL et al. (1982) e DELAZARI et al. (1978) comprovaram a produção da enterotoxina A quando a população do *S. aureus* atingia populações de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> em Queijo Tipo Minas Frescal, demonstrando o perigo da multiplicação de *S. aureus* durante a vida de prateleira.

A intoxicação alimentar estafilocócica se classifica como uma das causas mais frequentes de gastroenterites em todo o mundo (DOYLE, 2001). No Brasil destaca-se o trabalho de CARMO (2001) que relata 660 pessoas com toxinfecções alimentares e um óbito originadas de 23 surtos causados pela ingestão de toxinas estafilocócicas em diversos queijos no Estado de Minas Gerais do ano de 1995 a 2001. Em outro estudo CARMO et al. (2002) verificaram vários surtos relacionados a estirpes de *S. aureus* enterotoxigênicas em Manhuaçu e Passa-Quatro - MG, Brasil. Num primeiro surto, 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de Queijo Tipo Minas Frescal e, num segundo surto, foram afetados 328 indivíduos após consumirem leite cru.

FREITAS (1995) destaca que equipamentos e utensílios contaminados e com higienização deficiente são responsáveis por aproximadamente 16% do total de surtos notificados.

Assim, ressalta-se no presente estudo, a necessidade da adoção de medidas eficazes de higienização dos equipamentos, obtenção de matéria prima de melhor qualidade microbiológica, higienização constante das mãos e utilização de luvas uma vez que foi constatada a participação do manipulador como fonte de contaminação do queijo.

É relevante destacar que a identificação de genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico no fluxograma do processamento do Queijo Tipo Minas Frescal desta micro-usina evidencia o risco potencial que este produto pode representar para a saúde da população consumidora.

### 5.5. Determinação do potencial toxigênico de estirpes de *Staphylococcus aureus*

As 25 amostras de *S. aureus* positivos na PCR como portadores de genes codificadores de enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e a TSST-1 (*tst*) (Tabela 4) foram analisadas por intermédio da imunodifusão, a partir da utilização do método de placa de sensibilidade ótima (OSP, *optimum-sensitivity plate method*) mas somente uma estirpe isolada da superfície interna do tanque de estocagem foi produtora da enterotoxina (SEC), diferente do estudo de TAKEUCHI et al. (1998) de tanques de expansão utilizados para resfriamento e armazenamento de leite, onde 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas demonstraram capacidade de produzir toxinas.

A presença de genes codificadores de enterotoxinas não indica, necessariamente, a capacidade do micro-organismo de produzir toxina (MCLAUHLIN et al., 2000). A produção de enterotoxinas por *S. aureus* depende de distintos fatores, como requerimentos nutricionais, temperatura, sais, pH, atividade de água, entre outros (SMITH et al., 1983). *S. aureus* também requer certos componentes orgânicos para sua nutrição, e isto influi na produção ou não de enterotoxinas. Pode-se citar como exemplo que a presença de arginina é essencial para a produção de enterotoxinas B (WU & BERGDOLL, 1971). Outros trabalhos demonstram que a quantidade de enterotoxina A (MARKUS & SILVERMAN, 1970) e de enterotoxina B (GENIGEORGIS & SADLER, 1966) diminuem com o incremento dos níveis de NaCl.

No entanto, o fato de uma estirpe de *S. aureus* conter um ou mais genes codificadores de enterotoxinas é relevante, pois pode oferecer risco à saúde pública caso encontre condições favoráveis à produção de enterotoxinas.

## 6. CONCLUSÕES

➤ O conhecimento da presença de estirpes de *S. aureus* de potencial toxigênico corrobora para um cuidado maior na elaboração do Queijo Tipo Minas Frescal de modo a minimizar a possibilidade de casos de intoxicação alimentar.

O manipulador é uma relevante fonte de contaminação do Queijo Tipo Minas Frescal na micro-usina estudada.

➤ O gene da enterotoxina A apresentou maior frequência (56%) de identificação.

Apenas uma estirpe (gene *sec*) foi capaz de expressar experimentalmente seu potencial enterotoxigênico.

➤ O conhecimento do perfil molecular dos *S. aureus* possibilita a melhor compreensão dos estudos epidemiológicos de dispersão destes patógenos na micro-usina objeto desta investigação.

Foi verificada variabilidade genética entre as 41 estirpes de *S. aureus* circulantes, uma vez que foram identificados 22 pulsotipos na micro-usina estudada.

Foi verificada a contaminação cruzada de pulsotipos entre áreas da fase pré-pasteurização e pós-pasteurização.

➤ O Queijo Tipo Minas Frescal produzido na micro-usina estudada representa risco potencial ao consumidor no que se refere à Intoxicação Alimentar Estafilocócica.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados pode-se destacar a adoção de algumas medidas que devem ser seguidas durante a elaboração do Queijo Tipo Minas Frescal na micro-usina estudada para a melhora da qualidade microbiológica do produto final:

- a) Adoção de Procedimento Operacional Padrão para sanitização dos equipamentos, seguindo rigorosamente os passos;
- b) Manutenção e monitoramento de equipamentos que possam ser risco potencial de contaminação do produto final como, por exemplo, as tubulações e o pasteurizador;
- c) Cuidados com a qualidade da matéria prima recebida, identificando os rebanhos com problemas de mastite subclínica e orientando os produtores sobre os cuidados a serem tomados durante a ordenha e com a sanidade animal;
- d) Sugere-se a divisão do fluxograma de fabricação do queijo em áreas de pré-pasteurização e pós-pasteurização para que os funcionários, específicos de cada área, não circulem em outras áreas, evitando a disseminação dos diferentes pulstotipos encontrados;
- e) Conscientizar o manipulador da importância da higienização constante das mãos, além do uso obrigatório de luvas e do seu papel como possível fonte de contaminação do produto final.

## 8. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

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

ALBUQUERQUE, I. P.S.; RODRIGUES, M. A. M. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 162, p. 101-105, 2008.

ALLMAN, M.; HOFELEIN, C.; KOPPEL, E.; LUTHY, J.; MEYER, R.; NIEDERHAUSER, C.; WEGMULLER, B.; CANDRIAN, U. Polymerase chain Reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 146, p. 86-97, 1995.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.

AMARAL, L.; ROSSI JUNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F. I.; BARROS, L. S.; Ocorrência de *Staphylococcus* spp. em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 620-623, 2003.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NRB-6023, agosto / 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 1219 p.

ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.

ARAÚJO, W. N. de; SILVA, M. H.; MARTINEZ, T. C. N.; SILVA, A. V. A. F.; SILVEIRA, V. F. da; BARROS, S. L. B. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, BA, v. 2, n.1, p. 5-9, 2001a.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. N.; MARTINEZ, T. C. N.; SILVEIRA, V. F. da; BARROS, S. L. B.; SILVA, A. V. A. F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializados na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, BA, v. 2, n. 2, p. 37-42, 2001b.

ASSUMPÇÃO, E. G; PICOLLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 366-370, 2003.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, suppl. S19, p. 1S-8S, 1990.

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

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

BEAN, N. H.; GRIFIN, P. M. Foodborn disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 804-817, 1990.

BERGDOLL, M. S. The Staphylococcal enterotoxinas. In: MATELES, R. I.; WOGAN, G. N. **Biochemistry of Some Foodborn Microbial Toxins**, Cambridge, MA. Ed.: MIT Press, p. 1-25, 1967.

BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **Journal of Immunology**, Bethesda, MD, v. 83, p. 334-338, 1959.

BESSESEN, M. T. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2930 – 2932, 1990.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxin, toxic shock syndrome and staphylococcal pyrogenic enterotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemical and Immunology**, New York, v. 55, n. 1, p. 1-35, 1992.

BORDER, P. M. et al. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 13, p. 158-162, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do Queijo Tipo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19684.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Morbidade hospitalar do SUS por local de internação**. Secretaria Executiva, SIH/SUS, DATASUS, Brasília, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRECKINRINDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **New England Journal of Medicine**, Boston, MA, v. 284, n. 10, p. 541-543, 1971.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO J. R. F.; SOUZA, H. M. DE; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

CAMPOS, M. R. J. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. da. S.; JAYME, L. B., SANTOS, P. P. SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

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.

CARMO, L. S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e da toxina TSST-1 para uso de ensaios imunoenzimáticos**. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J. de; SANTOS, D. A. dos; FARIA, M. E. de; 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**, Washington, v. 19, p. 9-14, 2002.

CLEMENTE, M. das G.; VALLE, R. H. P. do; ABREU, L. R. de. *Staphylococcus* em queijos fabricados com leite cru e pasteurizado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 38-39, 2003.

CLEMENTS, M. O.; FOSTER, S. J. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**. Cambridge, v. 7, n.11, p. 458-462, 1999.

COLLINS, D. M.; R ADFORD, A. J.; D E LISLE, G. W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 83-94, 1994.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.

DANIELSSON, M. L.; HELLBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v.18, n.2, p. 266-273, 1977.

DELAZARI, I.; LEITÃO, M. F. F.; GERALDINE, A. N.; EIROA, M. N. U.; VALLE, J. L. E. Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas em queijo tipo Minas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 9, p. 163-174, 1978.

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

DOLCE, O.; POMPEO, J. N. Fundamentos de matemática elementar: **Geometria Espacial**. São Paulo: Atual, v.10, 1996. 448 p.

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, n.1-2, p. 167-174, 1994.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd. Washington, DC: ASM Press, 2001. 376 p.

EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 311-316, 1988.

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

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (Supl.), p. 162-165, 2003.

FERREIRA, L. M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina**. 2008. 88f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

FRÉNAY, H. M. E.; BUNSCHOTEN, A. E.; SCHOOLS, L. M.; VAN LEEUWEN, W. J.; VANDENBROUKE-GRAULS, C. M. J. E.; VERHOEF, J.; MOOI, F. R. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. on the basis of protein A gene polymorphism. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. Munich, v. 15, p. 60-64, 1996.

GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of *staphylococci* isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 584-553, 1980.



GENIGEORGIS, C.; SADLER, W. W. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, p.1383-1387, 1966.

GOMES, H. A.; GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados em Piracicaba – SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 158-161, 1995.

GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; COELLO, M.T.; ALONSO, S.; HEREDIA, F.J. Validation of parameters in HACCP verification using univariate and multivariate statistics. Application to the final phases of poultry meat production. **Food Control**, v. 12, n. 5, p. 261-268, 2001.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise Multivariada de dados**, Porto Alegre, 5.ed. Editora Bookman, 2005. 593 p.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior In foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 4, p. 267-282, 1989.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V. da; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

ICHIKAWA, M.; ICHIKAWA, T.; MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. **Animal Science Technology**, v. 67, p. 780-786, 1996.

ISEPON, J. S.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira, SP. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 17, n.106, p. 89-94, 2003.

JARRAUD, S. ; COZON, G.; VANDENESCH, F.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2446-2449, 1999.

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.

JONES, D. D.; BEJ, A. K. Detection of foodborn microbial pathogens using polymerase chain Reaction methods. In: GRIFFIN, H. G.; GRIFFIN, A. M. **PCR Technology: Current Innovations**. London: CRC Press, p. 341-365, 1994.

JONES, T. O.; WIENEKE, A. A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Veterinary Record**, Barcelona, v. 119, p. 435, 1986.

KENNY, K.; REISER, R. F.; BASTIDA-CORCUERA, F. D. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.

KWOK, A. Y. C.; CHOW, A. W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 87-92, 2003.

LAMPS, M. D. L. W. Pathology of food-borne infectious diseases of the gastrointestinal tract: an update. **Advances in anatomic pathology**. v. 10, n. 6, 2003.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

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

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

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

LUKINMAA, S.; NAKARI, U. M.; EKLUND, M.; SIITONEN, A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 112, n. 12, p. 908-929, 2004.

MacFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEIL, 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.

MAGALHÃES, D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARIN, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MANDIL, A.; MORAIS, V. A. D.; PEREIRA, M. L.; FAGUNDES, J. M. S.; CARMO, L. S.; CORREIA, M. G.; CASTRO, E.P.; GOMEZ, M. J. V. M. *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “Minas”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 2, n. 2, p. 233-241, 1982.

MANFREDI, E. A.; LEOTTA, G. A.; RIVAS, M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 42, p. 212-215, 2010.

MARIN, M. E.; ROSA, M. C. de la; CORNEJO, I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 1067-1069, 1992.

MARKUS, Z. H.; SILVERMAN, G. J. Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 20, n. 3, p. 492-496, 1970.

MARQUES, C. S., **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARTIN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M. C. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from

three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 279-286, 2004.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KIKIICHI, N. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 2, p. 297-300, 1993.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F.C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacilin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.

MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise Microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina.** 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

MEYER, R.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 268-271, 1991.

MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUI, A.; GASPARD, C. E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C.; VERNZOY-ROSARD, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goat's milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 537-544, 1998.

NOLETO, A. L.; BERGDOLL, M. S. Production of enterotoxin by a *Staphylococcus aureus* strain that produces three identifiable enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, p. 1096-1097, 1982.

OLSVIK, O.; FOSSUM, K.; BERDAL, B. P. Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococcaceae. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 90, p. 441-444, 1982.

OMAIRI, L. **Avaliação da qualidade e identidade do Queijo Tipo Minas Frescal comercializado na cidade de Campinas – SP**. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2002.

PARK, C. E.; AKTAR, M.; RAYMAN, K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Tecra) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2509-2512, 1992.

PEDERSEN, J. C.; JACOBSEN, C. S. Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) in soil during water stress: effects on

culturability and viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1560–1564, 1993.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 32-34, 2005.

PEREIRA, M. L.; GASTELO, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, p. 421- 426, 1999a.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella sp.* em queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 51, n. 5, p. 427-431,1999b.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, p. 48-55, 1999c.

PEREIRA, M. A.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERDOLL, M. S. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68, p. 32-39, 2000.

REALI, D. Enterotoxin A and B production in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from human beings and foods. **The Journal of Hygiene**, London, v. 88, n. 1, p. 103-106, 1982.

RIJPENS, N. P.; HERMAN, L. M. F. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 4, p. 984-995, 2002.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. S. Detecting the enterogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 946-950, 1974.

ROSA, V. P. da.; PORTO, E.; SPOTO, M. H. F. Avaliação microbiológica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n.132, p. 58-64, 2005.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

SANTOS, A. L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em Queijo Tipo Minas Frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2004.

SANTOS, E. C.; GENIGEORGIS, C. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas Cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, p. 177-184, 1981.

SANTOS, F. G. B. **Estudo epidemiológico molecular e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos estados de São Paulo e Pernambuco**. 2009. 45f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009a.



SANTOS, J. M.; MAIA, A. S. dos. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v. 6, suppl. B, p. 550-551, 1997.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009b.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from ratividade de água bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 101–107, 2004.

SCHEU, P.; GASCH, A.; BERGHOF, K. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, Washington, v. 15, p. 13 – 31, 1998.

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

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia dos Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 227 p.

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5.ed. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. DOS; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

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

SMITH, K.; HOGAN, J. Environmental Mastitis. In: HUNT, E.; ANDERSON, K. L. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. Ed: W.B. Saunders Company, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 489-498, 1993.

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

SOUTO, L. I. M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo**. 2006. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, V. **Epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes pontos do fluxograma de produção do leite**. 2010. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.

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

TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 251-258, 1998.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18 n. 6, p. 426-439, 1997.

TRANTER, H. S.; BREHM, R. D. Production, purification and identification of the Staphylococcal enterotoxins. In: JONES, D. **Staphylococci**. Ed.: Blackell Scientific Publications, Oxford, p. 109-122, 1990.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from goat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1323-6, 1990.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M. E. et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of Smal macrorestriction fragments: a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1653-1659, 1998.

VOLKMAN, H.; IMINIANOVSKY, U.; CAVALHERI, N. A.; MEISEN, N. M.; REITER, M. G. R. Avaliação microbiológica de diferentes tipos de queijos produzidos em Rodeio,

SC. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 165-166, 2002.

WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas consumido no município de Cuiabá – MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 27, p. 23-29, 1993.

WIENEKE, A. A.; GILBERT, R.J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 135-143, 1987.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. **Staphylococcal food poisoning**. 2ed. London: Elsevier, 2002.

WU, C.; BERGDOLL, M. S. Stimulation of Enterotoxin B Production II. Synthetic Medium for Staphylococcal Growth and Enterotoxin B Production. **Infection and Immunity**, v. 3, n. 6, p. 784–792, 1971.

ZADOKS, R. N.; VAN LEEUWEN, W. B.; KREFT, D.; FOX, L. K.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 3894-3902, 2002.

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 em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2009.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 56-65, 2008.