



**Universidade Federal do Ceará**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ANA PAULA COLARES DE ANDRADE**

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E PESQUISA DE GENES  
CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE  
QUEIJO DE COALHO**

**Fortaleza**

**2009**

**ANA PAULA COLARES DE ANDRADE**

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E PESQUISA DE GENES  
CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE  
QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração:  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora:  
Profª Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Co-Orientadora:  
Dra. Maria de Fátima Borges

**Fortaleza  
2009**

A565i Andrade, Ana Paula Colares de  
Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores  
de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de Coalho /  
Ana Paula Colares de Andrade, 2009.  
71 f. ; il. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
Co-orientadora: Dra. Maria de Fátima Borges  
Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências Agrárias. Depto. de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, 2009.

1. Queijo de Coalho. 2. Enterotoxinas estafilocócicas. 3. PCR. 4.  
*Staphylococcus* spp. I. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de (orient.) II.  
Borges, Maria de Fátima (co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará –  
Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. IV. Título

CDD 664

ANA PAULA COLARES DE ANDRADE

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E PESQUISA DE GENES  
CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE  
QUEIJO DE COALHO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração Microbiologia de Alimentos.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientador)**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Pesquisadora Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Borges (Co – orientadora)**  
**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

**Pesquisadora Dr<sup>ª</sup>. Terezinha Feitosa**  
**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra. Isabela Montenegro Brasil**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Juliane Doering Gasparing Carvalho**  
**Universidade Federal do Ceará**

**À Deus, por ter sempre guiado a minha vida;**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização deste curso;

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos durante o curso;

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo suporte de laboratórios, material e equipamentos;

Aos meus pais, João Andrade e Maria Colares, e meus irmãos João Paulo e Ana Raquel, pelo amor, carinho, incentivo nas minhas escolhas e pela presença constante;

Ao meu noivo Djacir Júnior, pelo amor, companheirismo, apoio e incentivo sempre demonstrado;

À Prof<sup>a</sup> Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pela orientação, confiança e amizade;

À Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Borges, pela amizade, orientação, confiança, dedicação, incentivo e apoio não só na realização deste trabalho, mas em toda a minha vida acadêmica e profissional;

À Dr<sup>a</sup> Terezinha Feitosa Machado, pela amizade, disponibilidade, apoio técnico e possibilidade de realização desse trabalho;

À Dr<sup>a</sup> Juliane Doering Carvalho, pela amizade, incentivo e colaboração;

À Dr<sup>a</sup> Laura Maria Bruno, pela amizade, orientação, incentivo e apoio;

À Dr<sup>a</sup> Patrícia Bordallo, pela enorme atenção, pelos ensinamentos, colaboração e sugestões apresentadas nessa pesquisa;

Às estagiárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, pelo apoio e agradável convivência, facilitando a execução deste trabalho e transformando as dificuldades do dia a dia em momentos prazerosos e alegres;

À Bruna Porto, pelo auxílio no decorrer do desenvolvimento desse trabalho;

Aos estagiários do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical pelo apoio e auxílio na realização desse trabalho;

Aos amigos e colegas do mestrado, pelo convívio e troca de experiências durante esta caminhada;

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho;

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pela concessão da bolsa.

## RESUMO

O queijo de Coalho é muito consumido na região Nordeste e, sua produção, representa importante atividade econômica e social. Porém, seu processamento e comercialização em condições inadequadas, tornam esse produto um dos principais veículos de bactérias patogênicas, com destaque para *Staphylococcus* sp., propiciando o desenvolvimento de doenças de origem alimentar em humanos. Com o objetivo de avaliar o perfil de contaminação de queijo de Coalho por *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa e, avaliar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, foram analisadas 300 amostras de queijos de Coalho, proveniente de 15 marcas, dentre as quais sete artesanais e oito industriais. As amostras foram submetidas à pesquisa de *Staphylococcus* sp. e após isolamento e caracterização bioquímica convencional, foram selecionados 207 isolados de *Staphylococcus* sp. para identificação fenotípica (API<sup>®</sup>-STAPH) e genotípica, através da pesquisa do gene *femA* e detecção de genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*) codificadores de enterotoxinas, utilizando-se a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram identificadas 14 espécies de *Staphylococcus*, sendo três coagulase positiva e onze negativa, com destaque para: *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. cohnii* spp. *urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. intermedius*. Em todas as amostras de queijo de Coalho artesanais houve prevalência de *S. aureus*; enquanto que nas amostras industriais predominaram *S. xylosus* (87,5%) e *S. cohnii* spp. *cohnii* (50%). A presença do gene *femA* foi detectada em 95% (38/40) dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e em 16,4% (9/55) dos isolados coagulase negativa. Entre os genes codificadores de enterotoxinas avaliados, houve prevalência do gene *seh* (53,2%) em cepas coagulase positiva e do gene *seg* (46,8%) em cepas coagulase negativa. Os resultados sugerem uma reavaliação dos padrões microbiológicos brasileiros em relação ao gênero *Staphylococcus* em alimentos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* spp., enterotoxinas estafilocócicas, PCR

## ABSTRACT

The Coalho cheese is much consumed in region Northeast and its production represents an important economic and social activity. However, processing and marketing in inadequate conditions, make this product one of the main vehicles of pathogenic bacteria, with emphasis on *Staphylococcus* sp., favoring the development of food borne diseases in humans. In order to evaluate the profile of contamination of Coalho cheese by *Staphylococcus* coagulase positive and negative, and to evaluate the occurrence encoding genes of staphylococcal enterotoxins, were analyzed 300 samples of Coalho cheese, from 15 marks, being seven artisanal and eight industry. The samples were submitted search for *Staphylococcus* sp. and after conventional biochemical characterization and isolation, were selected 207 isolates of *Staphylococcus* sp. for phenotypic identification (API<sup>®</sup>-Staph) and genotypic, through *femA* gene search and detection of genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* and *sej*) encoding enterotoxins using the technique of the polymerase chain reaction (PCR). Were identified 14 species of *Staphylococcus*, three coagulase positive and eleven negative: *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. cohnii* spp. *urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* and *S. intermedius*. In all samples of Coalho cheese artisanal was prevalence of *S. aureus*, while in industrial samples predominated *S. xylosus* (87.5%) and *S. cohnii* spp. *cohnii* (50%). The presence of *femA* gene was detected in 95% (38/40) of isolates of *Staphylococcus* coagulase positive and 16.4% (9/55) isolates of coagulase negative. Among the genes encoding for enterotoxins evaluated, there was prevalence of the gene *seh* (53.2%) in coagulase positive strains and the gene *seg* (46.8%) in coagulase negative strains. The results suggest a reevaluation of the microbiological Brazilian's standards in relation to the genus *Staphylococcus* in food.

**Key - words:** *Staphylococcus* spp., staphylococcal enterotoxins, PCR



## LISTA DE FIGURAS

### APÊNDICE A

- Figura A.1** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 10 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho artesanal; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). 64
- Figura A.2** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 11 a 20 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho artesanal; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). 64
- Figura A.3** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 21 a 30 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho industrial; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). 65
- Figura A.4** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 31 a 40 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho industrial; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). 65

### APÊNDICE B

- Figura B.1** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa de queijo de Coalho artesanal. Poços de 1 a 9 positivos para o gene *femA*. C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). 66

### APÊNDICE C

- Figura C.1** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh*, em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 11, 12, 15, 18 e 19 isolados positivos para *seh*; amostras 14 e 16 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub>: controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095); C<sup>+</sup><sub>H</sub>: controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas) 67
- Figura C.2** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *sei*<sub>1</sub>/*sei*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *sei* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 2, 8, 9 e 10 isolados positivos para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>I</sub>: controle positivo para *sei* (*S. aureus* ATCC 19095); C<sup>+</sup><sub>H</sub>: controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 68

- Figura C.3** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub>, para o gene *seg* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 11 a 18 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 68
- Figura C.4** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 21 a 30 isolados positivos para *seh*; amostras 21 e 22, isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 69
- Figura C.5** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 31, 32, 36, 38 e 40 isolados positivos para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 69
- Figura C.6** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> para o gene *seg* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 1 a 9 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095).. M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 70
- Figura C.7** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para o gene *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostra 11 positiva para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas). 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros importantes para crescimento de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas em alimentos _____	21
Tabela 2. Tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificadores _____	25
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a amplificação de gene específico para espécies de <i>Staphylococcus</i> e detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas _____	36
Tabela 4. Perfil de espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas em diferentes amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	40
Tabela 5. Frequência de espécies de <i>Staphylococcus</i> , identificadas pelo sistema API®-STAPH, nas amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	41
Tabela 6. Pesquisa do gene <i>femA</i> em <i>S. aureus</i> isolados de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	43
Tabela 7. Pesquisa do gene <i>femA</i> em cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	43
Tabela 8. Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de <i>Staphylococcus</i> isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	44
Tabela 9. Ocorrência dos genes <i>seg</i> e <i>seh</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados em diferentes amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial _____	45
<b>APÊNDICES</b>	
Tabela A.1. Pesquisa do gene <i>femA</i> em cepas de <i>S. aureus</i> isoladas em amostras de queijos de Coalho, artesanal e industrial, através da técnica PCR _____	63
Tabela B.1. Pesquisa do gene <i>femA</i> para isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa _____	66
Tabela C.1. Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial. _____	67
Tabela C. 2. Frequência dos genes <i>seg</i> e <i>seh</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de queijo de Coalho artesanal e industrial. _____	71

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO _____	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	16
2.2. Aspectos Microbiológicos do queijo _____	17
2.3 <i>Staphylococcus</i> sp. _____	19
2.4. Intoxicação Alimentar Estafilocócica _____	20
2.5. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos _____	22
2.6. Enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores de enterotoxinas _____	23
2.7. Reação de polimerização em cadeia - PCR _____	26
2.8. Uso da PCR na identificação de <i>Staphylococcus</i> _____	27
3. OBJETIVOS _____	31
3.1. Objetivo Geral _____	31
3. 2. Objetivos específicos _____	31
4. MATERIAL E MÉTODOS _____	32
4.1. Obtenção e coleta das amostras _____	32
4.2. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> sp. _____	32
4.3. Identificação fenotípica de <i>Staphylococcus</i> sp. _____	32
4.3.1. Identificação com base em testes bioquímicos convencionais _____	33
4.3.1.1. Ativação das culturas _____	33
4.3.1.2. Coloração de gram _____	33
4.3.1.3. Produção de catalase _____	33
4.3.1.4. Produção de coagulase _____	33
4.3.1.5. Produção de DNase _____	34
4.3.1.6. Sensibilidade a lisostafina _____	34
4.3.1.7. Utilização anaeróbica de glicose e manitol _____	34
4.4. Identificação pelo sistema API® - STAPH _____	35
4.5. Identificação Molecular _____	35
4.5.1. Extração de DNA _____	35
4.5.2. Reação de polimerização em cadeia – PCR _____	36
4.5.2.1. <i>Primers</i> _____	36
4.5.2.2. Condições da reação de PCR _____	37
4.5.2.3. Pesquisa do gene <i>femA</i> em cepas de <i>Staphylococcus</i> _____	37

4.5.2.4. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas em cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e negativa _____	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES _____	39
6. CONCLUSÕES _____	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	48
APÊNDICES _____	63
APÊNDICE A _____	63
Pesquisa do gene <i>femA</i> em <i>S. aureus</i> isolados em amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial. _____	63
APÊNDICE B _____	66
Pesquisa do gene <i>femA</i> em cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas em amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial. _____	66
APÊNDICE C _____	67
Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em <i>Staphylococcus</i> spp., isolados das amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial. _____	67

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os produtos lácteos mais consumidos, destacam-se os queijos e, na região Nordeste, a ênfase é dada ao queijo de Coalho, que se obtém por coagulação do leite pela adição do Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001).

A produção de queijo de Coalho representa importante atividade sócio-econômica para os estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, sendo a maior parte de sua fabricação de origem artesanal. No Estado do Ceará, como em toda região Nordeste a produção de queijo de Coalho pode ser dividida em dois setores: os das médias empresas, fiscalizadas por órgãos oficiais, e o das pequenas unidades artesanais, localizadas, principalmente, na zona rural, sem qualquer fiscalização (NASSU *et al.*, 2001). Àquelas que seguem os requisitos mínimos da legislação, elaboram seus queijos com leite pasteurizado, podendo classificá-lo como industrializado; porém a grande maioria da produção artesanal utiliza leite cru, o que pode resultar em um produto que não apresenta segurança microbiológica.

O queijo, principalmente o artesanal, por ser elaborado na maioria das vezes a partir de leite cru e em condições insatisfatórias de higiene, tem sido considerado fonte de patógenos veiculados por alimentos. Por isso, a segurança microbiológica desse produto é de grande importância para a saúde do consumidor pelo perigo de causar doenças transmitidas por alimentos.

Com base em resultados da literatura, o nível de contaminação em queijo de Coalho tem sido elevado devido à presença de bactérias patogênicas, com destaque para o gênero *Staphylococcus* (BOARI *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2008; CUNHA NETO *et al.*, 2002; FREITAS, 2005; LIMA, 2005).

*S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissível aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A ocorrência de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos representa um risco potencial para a saúde pública, uma vez que essas espécies, quando presente nos

alimentos, podem produzir uma ou mais enterotoxinas, que depois de ingeridas, causam intoxicação alimentar, sendo *S. aureus* a espécie de maior prevalência em surtos e casos esporádicos de intoxicação. A presença desse patógeno e suas enterotoxinas tem sido constatadas, com freqüência, em produtos como leite cru e queijos. Recentemente, a lista de enterotoxinas foi expandida pela detecção de novos genes e até o momento, já foram identificados 20 tipos de enterotoxinas distintas, mas que possuem similaridade na estrutura e seqüência. As clássicas (SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED e SEE), são as de maior ocorrência, e outras treze enterotoxinas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) foram identificadas e seus genes (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu*) correspondentes descritos.

O emprego da técnica PCR, por meio da amplificação do gene *femA* ou parte dele, tem sido uma ferramenta útil na diferenciação de várias espécies de *Staphylococcus* sendo, portanto, uma alternativa rápida e segura para identificação desta bactéria. Entretanto, a detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, vem sendo realizada por meio da técnica multiplex PCR, que consiste na amplificação simultânea de vários genes pelo uso de múltiplos pares de *primers* na mesma reação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos gerais do queijo

O queijo surgiu a 8000 anos no Oriente Médio, quando o primeiro alimento à base de leite fermentado foi elaborado. Esse produto é considerado um dos alimentos mais antigos preparados pela humanidade e é, provavelmente, a forma mais arraigada e comum de preservar por um período maior os mais importantes nutrientes do leite (SANTOS, 1990; BRASIL, 1989).

Dentre as hipóteses sobre a descoberta do queijo, a mais considerada relaciona o uso de recipientes ou sacos feitos com partes de estômagos de animais, onde o leite era transportado e guardado. O contato do leite com as enzimas liberadas pelo estômago desses animais promovia sua coagulação, gerando uma massa branca de sabor agradável. Admite-se que, com o passar dos tempos, a massa foi colocada em formas, adicionada de sabores e maturada, sendo o produto resultante chamado de queijo (ANDRADE, 2006).

Na produção de queijos, são necessários quatro ingredientes básicos e essenciais: leite, enzimas coagulantes, sal e micro-organismos, além de etapas fundamentais, tais como a acidificação, coagulação, sinerese e maturação. A combinação única de ingredientes e parâmetros de processamento leva a obtenção de tipos específicos de queijos com propriedades peculiares. (FOX *et al.*, 2000).

No Brasil, admite-se como data inicial da fabricação de queijos, em escala comercial, o ano de 1885, quando técnicos holandeses foram contratados para uma fábrica de laticínios em Minas Gerais. A adaptação de técnicas da produção de queijo “holandês” permitiu a elaboração do primeiro queijo no país (RIBEIRO, 1959).

No Ceará e nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, o destaque fica para a produção de queijo de Coalho, considerado um produto lácteo tradicional do Nordeste brasileiro, cuja fabricação representa importante atividade sócio-econômica para esses estados, sendo a maior parte da produção de origem artesanal.

A origem do queijo de Coalho está relacionada com o fato de ser elaborado tradicionalmente com o leite coagulado pela ação do Coalho extraído do quarto estômago de



pequenos animais tais como cabrito, bezerro, preá, moco, os quais, devidamente preparados, são chamados de abomasun ou coagulador (AQUINO, 1983).

O queijo de Coalho, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, pode ser definido como o queijo que se obtém por coagulação do leite pela adição do Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. (BRASIL, 2001).

A produção de queijo de Coalho no estado do Ceará, assim como em toda a região Nordeste, pode ser dividida em dois segmentos: o das médias empresas, fiscalizadas por órgão oficiais, e o das pequenas unidades artesanais, localizadas, principalmente, na zona rural, sem qualquer fiscalização. As unidades produtoras desse queijo, no estado do Ceará, estão situadas em duas mesorregiões: o Vale do Jaguaribe (Limoeiro do Norte, Morada Nova, Jaguaribe, etc.) e Sertões Cearenses (Tauá, Crateús, Quixadá, Quixeramobim, etc.) (Nassu *et al.*, 2001).

Por ser um produto muito difundido, o queijo de Coalho pode ser encontrado em diversos locais de comercialização, tais como: feiras, confeitarias, armazéns, lojas de produtos nordestinos, supermercados, etc., sendo bastante consumido pela população, em todas as faixas de renda, de diversas maneiras (fresco, assado ou como ingrediente em diversos pratos regionais).

## **2.2. Aspectos Microbiológicos do queijo**

A microbiota que compõem o queijo é formada por bactérias lácticas, leveduras, fungos filamentosos e diversas bactérias. As leveduras, os fungos filamentosos e outras bactérias são responsáveis pela formação de uma microbiota secundária, que juntamente com as bactérias lácticas, estão envolvidas na produção de ácido lático durante a elaboração do queijo e no processo de maturação. Tanto as bactérias lácticas quanto a microbiota secundária modificam as características físicas e químicas do queijo, contribuindo para alterações - benéficas ou não - que ocorrem durante o processo de manufatura e maturação do queijo (FOX *et al.*, 2000).

As bactérias lácticas apresentam grande importância para a indústria de laticínios e para a produção de outros produtos fermentados e suplementos alimentares, sendo mais

conhecidas como culturas iniciadoras em produtos lácticos (CARR *et al.*, 2002). Dentre os 11 gêneros de bactérias lácticas conhecidos, os de maior prevalência em queijos artesanais são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (FOX *et al.*, 2000).

No Ceará, Feitosa (1984) avaliou a ocorrência de bactérias lácticas em amostras de queijos de Coalho artesanais e verificou que *Enterococcus* (69,5%), foi o principal gênero encontrado. Em outro estudo, Carvalho (2007) constatou que, entre 294 isolados de bactérias lácticas, provenientes de amostras de leite, massa de queijo e queijo de Coalho, que houve a predominância dos gêneros *Enterococcus* (51,0%), *Lactobacillus* (19,7%), *Streptococcus* (15,0%) e *Lactococcus* (14,3%).

Para a elaboração de um queijo de qualidade, a obtenção da matéria-prima requer alguns cuidados. Além de ser fonte de bactérias lácticas, o leite cru, se não for obtido sob condições adequadas de higiene, pode ser, também, veículo de micro-organismos patogênicos em queijos artesanais. Entretanto, a presença de patógenos em queijos elaborados com leite pasteurizado pode ser atribuída à contaminação pós-pasteurização (GRAPPIN; BEUVIER, 1997).

No Brasil, a ocorrência de micro-organismos indicadores e patogênicos como coliformes fecais, *Salmonella*, *Listeria* e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos, em níveis superiores aos estabelecidos pela legislação vigente (ANVISA, 2001) tem sido relatada em várias pesquisas (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; 2000; PEREIRA *et al.*, 1999; SALOTTI *et al.*, 2006).

Em amostras de queijo ralado comercializadas em Pelotas – RS, a presença de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva foi constatada em 13,3% (2/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. Apenas uma das 15 amostras apresentou níveis de contaminação superiores aos padrões estabelecidos pela legislação (CAMACHO *et al.*, 2007).

Carvalho (2003) avaliou a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal, comercializados em Campinas – SP e detectou a presença de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Listeria* sp. em 34,4% (32/93), 7,5% (7/93) e 11,8% (11/93), respectivamente, nas amostras analisadas. Apesar da quantidade total de amostras fora dos padrões legais para coliformes termotolerantes, indicadores da presença de bactérias enteropatogênicas, não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Em vários estudos, o queijo de Coalho tem sido considerado impróprio para o consumo devido a condições insatisfatórias de processamento e comercialização, que contribuem para o elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas (BORGES *et al.*,

2003; CASTELO BRANCO *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003; FLORENTINO, 1999; GRANDI; ROSSI, 2007).

Duarte *et al.*, (2005) avaliaram a incidência de *Listeria sp.*, *Salmonella sp.* e coliformes termotolerantes em amostras de queijo de Coalho, comercializados no Estado de Pernambuco e constataram a presença de *Listeria sp.*, *Salmonella sp.*, e coliformes termotolerantes, em 9,5% (12/127), 5,5% (7/127) e 44,1% (56/127), respectivamente, nas amostras avaliadas. Em outro estudo, Machado *et al.* (2007) avaliaram amostras de queijo de Coalho, comercializados em Fortaleza – CE, e detectaram a presença de *Salmonella sp.* e *Staphylococcus coagulase positiva* em 20% (16/80) e 58,7% (47/80), respectivamente, das amostras.

Entre as bactérias patogênicas de maior ocorrência em queijos de Coalho destacam-se espécies de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*. Essas bactérias, quando presentes em elevadas populações ( $10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup>) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O<sub>2</sub>), representam um problema de saúde pública pela habilidade de produzirem enterotoxinas e causar intoxicação alimentar estafilocócica.

### 2.3 *Staphylococcus sp.*

Os membros do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos, com 0,5 a 1,5µm de diâmetro, apresentando-se isolados, aos pares, em tétrades ou em forma de cachos de uva (BANNERMAN, 2003). São mesófilicos, tolerantes a concentrações salinas que variam entre 10% a 20%, crescem na faixa de pH de 4 a 9,8 e possuem a capacidade de crescerem em valores baixos de atividade de água (0,83 – 0,86) (FRANCO; LANDGRAF, 2004). São tipicamente encapsulados ou com formação de cápsula limitada, usualmente catalase positiva, não apresentam motilidade e nem produzem esporos, sendo os mesmos classificados como anaeróbios facultativos, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus subsp. anaerobius* (Bannerman, 2003),

De acordo com a classificação do *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (GARRITY *et al.*, 2004), esse gênero é constituído por 30 espécies e 20 subespécies, sendo consideradas como coagulase positiva *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* e as demais espécies são coagulase negativa (GARRITY *et al.*, 2004).

*Staphylococcus* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios. Geralmente, são encontrados nos pêlos, na pele, boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal destes hospedeiros. Certas espécies desse gênero são freqüentemente consideradas agente etiológico de diversas infecções em humanos e animais (BANNERMAN, 2003).

A espécie *S. aureus* é a principal responsável por doenças em humanos, estando essas associadas ao consumo de alimentos ou não. Estima-se que entre 30 - 50% da população humana seja portadora dessa bactéria (LE LOIR *et al.*, 2003). O principal habitat de *Staphylococcus* em humanos é a cavidade nasal e, por meio dela, atingem tanto a pele como ferimentos, a água, o ar, o solo, o esgoto, plantas de processamento de leite e diversos tipos de alimentos.

#### **2.4. Intoxicação Alimentar Estafilocócica**

A intoxicação alimentar estafilocócica é um dos tipos mais comuns de doenças veiculadas por alimentos. A doença é causada pelo consumo de alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas, pré-formadas, produzidas principalmente, por cepas de *S. aureus* e por outras espécies de *Staphylococcus*. É caracterizada como uma doença de curso rápido, devido ao seu curto período de incubação, ocorrendo tanto em casos isolados quanto em surtos que afetam um grande número de indivíduos. Porém, o curto período da doença, contribui para que casos e surtos não sejam relatados, o que leva a uma subnotificação da mesma (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Os principais sintomas da doença são vômitos, diarreia e dores estomacais que aparecem rapidamente, em torno de 1 a 6 horas, após a ingestão do alimento (JØRGENSEN *et al.*, 2005). Para a manifestação da doença, cerca de  $10^5$  células de *S. aureus* por grama de alimento são necessárias para produzir enterotoxina e apenas um micrograma da toxina ingerida é suficiente para causar esses sintomas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998).

Muitos fatores contribuem para o aparecimento dos sintomas da intoxicação estafilocócica e sua severidade, podendo-se destacar a suscetibilidade do indivíduo (crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos são os mais afetados) e a quantidade de toxina presente no alimento ingerido.

As enterotoxinas atuam no trato gastrointestinal de maneira emética e diarréica. Na forma emética, os sítios dessa ação estão localizados no intestino, onde o estímulo é transferido do nervo vago até o centro do vômito, ocasionando vômitos intensos devido a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado, caracterizando, assim, o sintoma de maior frequência em uma intoxicação estafilocócica (BALABAN; RASOOLY, 2000; DINGES *et al.*, 2000). A ação diarréica não tem o seu mecanismo de ação ainda bem definido, mas sabe-se que ocasiona a inflamação e irritação da mucosa do estômago e do intestino delgado (DINGES *et al.*, 2000).

Os parâmetros físicos e químicos (Tabela 1) como atividade de água, pH, temperatura, concentração salina e disponibilidade de oxigênio influenciam diretamente no crescimento de *Staphylococcus* sp. e na produção de enterotoxinas.

**Tabela 1.** Parâmetros importantes para crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos.

Parâmetro	Crescimento		Produção de enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Temperatura (°C)	35 - 37	7 - 48	35 - 40	10 - 45
pH	6,0 - 7,0	4,0 - 10,0	6,0 - 7,0	4,8 - 9,0
Atividade de água	>0,99	0,83 - 0,99	0,99	≥ 0,83 - 0,99
NaCl (%)	0 - 4	0 - 20	0 - 0,5	0 - 10
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica	Aeróbica (5-20% de O <sub>2</sub> )	Aeróbica Anaeróbica

Fonte: Fonte: ICMSF (1996)

Os principais alimentos envolvidos em uma intoxicação estafilocócica são produtos de panificação recheados com creme, carnes cozidas (por exemplo, presunto), pratos ou produtos que envolvem muita manipulação e leite e seus derivados (BHATIA; ZAHOOR, 2007).

O consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, tem sido associado à ocorrência de surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica em vários países (ASAO, 2003; CARMO *et al.*, 2002; DE BUYSER *et al.*, 2001; KÉROUANTON *et al.*, 2007; LECLERC *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2008). No Brasil, queijos tipo Minas (CARMO

*et. al.*, 2002) e de Coalho (INPPAZ/OPS/OMS, 2009) são os mais associados a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Segundo dados do Sistema de Informação Regional para a Vigilância Epidemiológica das Enfermidades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), no período de 1996 a 2002, no Brasil, 86 pessoas se envolveram em surtos de intoxicação estafilocócica relacionados ao consumo de queijos. Desses casos, dois ocorreram no Estado do Ceará no ano 2000, deixando 14 pessoas enfermas (INPPAZ/OPS/OMS, 2009).

Em 2003, cinco surtos de doenças transmitidas por alimentos – DTA ocorreram no estado do Ceará com o envolvimento de 311 pessoas. Desses surtos, um estava relacionado com o consumo de queijo Minas Frescal e queijo de Coalho, abrangendo um total de onze pessoas que sofreram intoxicação alimentar estafilocócica. Esses surtos foram notificados pelo Núcleo de Epidemiologia da Secretária de Saúde do Estado do Ceará, através do Informe Anual de Surtos de DTA (CEARÁ, 2004).

## **2.5. *Staphylococcus* enterotoxigênicos**

*Staphylococcus* enterotoxigênicos são espécies de *Staphylococcus*, coagulase positiva ou negativa, capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas quando presentes nos alimentos, os quais, depois de ingeridos, ocasionam intoxicação alimentar estafilocócica. A capacidade de produção de enterotoxinas tem sido relacionada com produção da enzima coagulase por *Staphylococcus* coagulase positiva, principalmente *S. aureus*. No entanto, cepas coagulase negativa também apresentam a habilidade de produzir enterotoxinas (Veras *et al.*, 2008). Entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa produtoras de enterotoxinas, destacam-se, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*; *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosus* e *S. warneri* (PEREIRA *et al.*, 2001).

No Brasil, Cunha Neto *et al.* (2002) avaliaram amostras de alimentos *in natura* e processados, incluindo queijo de Coalho, comercializados no estado de Pernambuco e observaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas por seis cepas avaliadas, *in vitro*, destacando *S. aureus* e *S. intermedius* como as espécies produtoras das enterotoxinas. Resultado semelhante foi encontrado por Barbosa *et al.* (2005) que pesquisaram *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo Coalho comercializadas em Teresina – PI e constataram a presença de *Staphylococcus* em 100 % (25/25) das amostras analisadas e em 36% (9/25) das cepas foi possível observar a produção de enterotoxinas. Em

outro estudo, Veras *et al.* (2008) avaliaram o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa obtidos de produtos lácteos envolvidos em surtos alimentares e verificaram que 66,7% (20/30) dos isolados produziram enterotoxinas estafilocócicas *in vitro*.

Em Minas Gerais, Borelli *et al.* (2006) detectaram enterotoxinas em 93,3% (70/75) *pools* de cepas de *Staphylococcus*, obtidos de leite e produtos lácteos, e constataram que as espécies que prevaleceram na produção das enterotoxinas foram *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.

No Ceará, uma pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e suas enterotoxinas em de queijo de Coalho mostrou que, embora 54% (43/80) das amostras apresentassem elevadas contagens de *Staphylococcus* spp., não foi detectada a presença de enterotoxinas estafilocócicas nas amostras avaliadas (LIMA, 2005).

Na Europa, Murru *et al.* (2005) avaliaram amostras de queijos comercializados na França e constataram que 100% (33/33) das cepas de *Staphylococcus* avaliadas apresentaram potencial enterotoxigênico, destacando-se as espécies *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. saprophyticus* e *S. warneri*. Em outro estudo, Zell *et al.* (2008) avaliaram amostras de alimentos, incluindo queijos duros e macios, comercializados na Alemanha, e observaram a produção de pelo menos um tipo de enterotoxina estafilocócica em 51,4% (18/35) das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, sendo *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. piscifermentans* e *S. xylosum* as espécies responsáveis pela produção

## 2.6. Enterotoxinas estafilocócicas e genes codificadores de enterotoxinas

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem a um grupo de proteínas de cadeia curta, de baixo peso molecular (27 a 34 KDa) produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus aureus*, podendo também ser produzidas por *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. xylosum* e *S. epidermidis* (BHATIA; ZAHOOOR, 2007). São classificadas dentro de um grupo de exotoxinas produzidas por *Staphylococcus*, conhecidas como toxinas pirogênicas superantígenos (DINGES *et al.*, 2000), que compartilham relações filogenéticas, estruturais, funcionais e homologia de sua seqüência (BALABAN; RASSOLY, 2000).

Em seu estado ativo, as enterotoxinas são resistentes a enzimas proteolíticas tais como tripsina, quimotripsina, renina e papaína sendo, também, consideradas resistentes ao calor. Manifestam similaridade na estrutura e seqüência por apresentarem quantidades relativamente grandes de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina, além de conterem

somente dois resíduos de meia cistina e de triptofano em sua cadeia polipeptídica simples (BERGDOLL *et al.*, 1974).

A nomenclatura, com letras do alfabeto, de cada enterotoxina, dá-se de acordo com a cronologia de sua descoberta (Tabela 2). Já foram identificadas até o momento 20 tipos de enterotoxinas, dentre as clássicas, classificadas de acordo com sua antigenicidade (SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED, SEE) e as descritas recentemente (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU) com seus respectivos genes codificadores. As mais recentes enterotoxinas descritas têm sido classificadas como membros da família das enterotoxinas baseada em sua seqüência e similaridade com as enterotoxinas clássicas. (BALABAN; RASOOLY, 2000; BANIA *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2008 ; MORANDI *et al.*, 2007; OMOE *et al.*, 2005).

A detecção de enterotoxinas estafilocócicas pode ser considerada, até o momento, limitada, pois os testes imunológicos disponíveis no mercado só detectam as enterotoxinas clássicas (SEA a SEE). No entanto, a pesquisa de novas enterotoxinas requer a utilização de técnicas moleculares (reação de polimerização em cadeia e suas variações) para a detecção de genes codificadores e das enterotoxinas.

Os genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seg<sub>v</sub>*, *seh*, *sei*, *sei<sub>v</sub>*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq*) codificadores das enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes em bacteriófagos, plasmídeos, no cromossomo e em ilhas de patogenicidade cromossomal (BAYLES; IANDOLO, 1989; KURODA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1998).

No Brasil, Veras *et al.* (2008) constaram a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em 33,3% (5/15) dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de produtos lácteos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, ocorridos no período de 1998 a 2002, no estado de Minas Gerais. Em outro estudo, Cunha *et al.* (2006) pesquisaram genes codificadores de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa e verificaram a presença dos genes *sea* (15%) e *sec* (5%). Resultado semelhante foi encontrado por Borges (2006) que detectou os genes *sea* e *sec* em 91,7% (11/12) dos isolados de *Staphylococcus* provenientes de leite cru (8/12), coalhada (1/12) e queijo de Coalho (1/12).



**Tabela 2.** Tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificadores.

<b>Tipos de SE</b>	<b>Genes codificadores</b>	<b>Referência</b>
SEA	<i>sea</i>	Betley; Mekalanos (1988); Becker et al. (1998)
SEB	<i>seb</i>	Bergdoll et al. (1959); Jones; Khan (1986); Becker et al. (1998)
SEC <sub>1</sub>	<i>sec<sub>1</sub></i>	Bergdoll et al. (1965); Borja; Bergdoll (1967); Bohach; Schievert (1987); Becker et al. (1998)
SEC <sub>2</sub>	<i>sec<sub>2</sub></i>	Bergdoll et al. (1965); Avena; Bergdoll (1967);
SEC <sub>3</sub>	<i>sec<sub>3</sub></i>	Reiser et al. (1984)
SED	<i>sed</i>	Casman et al. (1967); Bayles; Iandolo (1989); Becker et al. (1998)
SEE	<i>see</i>	Bergdoll et al. (1971); Couch et al. (1988); Becker et al. (1998)
SEG	<i>seg</i>	Betley et al. (1992); Munson et al. (1998); Omoe et al. (2002)
SEGV	<i>seg<sub>v</sub></i>	Blaiotta et al. (2004)
SEH	<i>seh</i>	Ren et al. (1994); Su; Wong (1995); Omoe et al. (2002)
SEI	<i>sei</i>	Munson et al. (1998); Omoe et al. (2002)
SEI <sub>v</sub>	<i>sei<sub>v</sub></i>	Blaiotta et al. (2004)
SEJ	<i>sej</i>	Zhang et al. (1998); Omoe et al. (2005)
SEK	<i>sek</i>	Orwin et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SEL	<i>sel</i>	Fitzgerald et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SEM	<i>sem</i>	Jarraud et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SEN	<i>sen</i>	Jarraud et al. (2001); Orwin et al. (2003); Omoe et al. (2005)
SENV	<i>sen<sub>v</sub></i>	Blaiotta et al. (2004)
SEO	<i>seo</i>	Jarraud et al. (2001); Omoe et al. (2005)
SEP	<i>sep</i>	Omoe et al. (2005)
SEQ	<i>seq</i>	Yarwood et al. (2002); Omoe et al. (2005)
SER	<i>ser</i>	Omoe et al. (2003); Omoe et al. (2005)
SEU	<i>seu</i>	Letertre et al. (2003)
SEU <sub>v</sub>	<i>seu<sub>v</sub></i>	Blaiotta et al. (2004)

Fonte: Borges, 2006.

Rosec e Gigaud (2002) pesquisaram os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sei* e *sej* em cepas de *Staphylococcus* isoladas de amostras de queijos elaborados com leite cru, comercializados na França, e constataram a amplificação de genes das novas enterotoxinas em 45,8% (54/118) e clássicas em 15,2% (18/118) das cepas avaliadas. Em outro estudo, Cremonesi *et al.* (2007) detectaram *S. aureus* enterotoxigênicos, isolados diretamente de

amostras de queijos elaborados com leite cru, e observaram a presença dos genes *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *sel* em 42,4% (14/33) dos isolados.

Na Itália, a identificação de genes (*sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *sel*) de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de amostras leite e produtos lácteos, incluindo queijos, mostrou que, para 112 cepas testadas, foram detectados um ou mais genes em 67% (75/112) das cepas enterotoxigênicas. Dessas 75 cepas, 20 continham somente um tipo de gene (13 *sea*, 2 *sed*, 1 *seg*, 3 *seh* e 1 *sei*), enquanto que as 55 remanescentes apresentaram mais de um gene (MORANDI *et al.*, 2007).

Chiang *et al.* (2008) avaliaram a ocorrência de genes de enterotoxinas em 147 cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica que ocorreram, entre 2001-2003, em Taiwan e observaram em 91,8 % (135/147) a presença de um ou mais genes, destacando-se, entre os genes das enterotoxinas clássicas, *sea* (29,2%) e *sei* (29,9%), entre os genes das novas enterotoxinas.

Akineden *et al.* (2008) pesquisaram genes (*sea* a *seo*) codificadores de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de queijos, comercializados na Alemanha, e detectaram o gene *sec* em 20% (13/64) e um dos genes (*sea*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen* ou *seo*) em 22% (14/64) dos isolados. Não foi constatada nesse estudo a presença dos genes *seh* ou *sej*.

A ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos, com destaque para leite e produtos lácteos, incluindo queijos, tem sido constatada em vários estudos (AKINEDEN *et al.*, 2008; BORGES, 2006; CHEN *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2008 ; CREMONESI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2006; HOLECKOVA *et al.*, 2004; MORANDI *et al.*, 2007; OMOE *et al.*, 2005; RALL *et al.*, 2008; ROSEC; GIGAUD, 2002).

## 2.7. Reação de polimerização em cadeia - PCR

A tecnologia da reação de polimerização em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramentos genéticos (ANTONINI *et al.*, 2004).

A alta sensibilidade do método de PCR, bem como a sua especificidade, permite amplificar uma seqüência alvo mesmo a partir de amostras com baixo grau de pureza e de

quantidades mínimas de DNA o que torna o método viável não só para a pesquisa básica, mas também para a pesquisa aplicada, inclusive no diagnóstico de inúmeras doenças. É um método baseado na amplificação enzimática de um determinado fragmento de DNA pela extensão de nucleotídeos que hibridizam com as fitas complementares de uma seqüência - molde também conhecida como seqüência - alvo (ALMEIDA *et al.*, 2004)

Diversas variações da técnica de PCR foram desenvolvidas para que o vasto campo de sua utilização possa superar as limitações técnicas decorrentes do avanço do conhecimento biológico. Essas variações permitem a amplificação de produtos a partir de RNA ou DNA, em diferentes concentrações, e processos de visualização cada vez mais específicos (ALMEIDA *et al.*, 2004). Dentre as várias técnicas de PCR desenvolvidas, as mais comuns são: a RT – PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested – PCR e PCR Competitiva.

A RT – PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction) consiste em um método de amplificação de ácidos nucléicos a partir de moléculas de RNA convertidas em DNA complementar (cDNA), sendo este utilizado como molde na reação de PCR que fornece dados quantitativos e/ou qualitativos.

Na Multiplex PCR, dois ou mais segmentos de DNA são utilizados na amplificação sendo empregado o par de *primer* específico para cada fragmento, o que facilita e simplifica alguns experimentos como testes de paternidade.

Nested – PCR consiste na realização de uma PCR utilizando como molde o produto amplificado numa primeira PCR. Neste caso, um produto amplificado é reamplificado a partir de *primers* que se hibridizam no interior do produto da primeira reação.

Na PCR Competitiva, além do DNA molde, é adicionado à reação outro trecho do DNA, de seqüência, tamanho e concentrações definidas (controle), cujas extremidades são complementares também aos primers que irão amplificar a seqüência alvo. O resultado é a amplificação de dois trechos de DNA, o de interesse e o controle.

## **2.8. Uso da PCR na identificação de *Staphylococcus***

A técnica de PCR tem sido uma ferramenta útil na identificação e avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp., por meio de pesquisas que utilizam genes específicos para certas espécies de *Staphylococcus* e pela detecção de genes codificadores das enterotoxinas. Vários protocolos foram desenvolvidos para viabilizar e aperfeiçoar esses

resultados (CREMONESI *et al.*, 2006; MEYRAND *et al.*, 2000; ROSEC; GIGAUD, 2002; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2004).

Muitas variações da técnica de PCR vêm sendo utilizadas para a identificação de espécies de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em amostras de leite e produtos lácteos e em casos de intoxicação alimentar estafilocócica (CHIANG *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2008; KWON *et al.*, 2004; LETRERTE *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2004)

Martin *et al.* (2004) utilizaram procedimentos genéticos tais como: eletroforese de campo pulsátil – PFGE, análise de restrição plasmidial e a técnica DNA polimórfico amplificado randomicamente – RAPD, para a identificação de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* provenientes de três surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ocorridos no período de junho a outubro de 2002, em Principado das Astúrias, na Espanha e observaram que 32 isolados foram diferenciados em três cepas não enterotoxigênicas e em 12 enterotoxigênicas, as quais foram atribuídas aos surtos estudados.

Akineden *et al.* (2008) avaliaram o potencial enterotoxigênico de *S. aureus* isolados de queijos, utilizando a técnica de RT – PCR, e constataram que os genes (*sea*, *sec*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *tst*) codificadores de enterotoxinas puderam ser agrupados em 18 genótipos e a expressão do RNAm foi observada em todos os genes, com exceção do *seo*.

O gene *femA* é um marcador que tem sido estudado e explorado para a espécie *S. aureus*. Esse gene codifica uma proteína essencial precursora da biossíntese do peptidoglicano nessa espécie (VERAS *et al.*, 2008). Vários estudos tem relacionado a amplificação do gene *femA* com a identificação fenotípica de *S. aureus*, o que permite diferenciá-la de outras espécies (BORGES, 2006; FREITAS, 2005; MEHROTRA *et al.*, 2000). Esse gene faz parte dos genes *fem* (*femX*, *femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE*), os quais codificam proteínas designadas de fatores essenciais para resistência a metilina (BENSON *et al.*, 2002).

Mehrotra *et al.* (2000) desenvolveram um protocolo para avaliar o potencial enterotoxigênico de cepas de *S. aureus* isoladas de amostras clínicas e detectaram a presença do gene *femA* em 100% (176/176) das amostras.

Borges (2006) empregou a técnica de PCR na identificação de *S. aureus* isolados de leite cru, e constatou em 73% (16/22) das cepas avaliadas a presença do gene *femA*. Em outro estudo, Zoche *et al.* (2007) pesquisaram genes codificadores de enterotoxinas e o *femA* em cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo Minas Frescal, comercializados em

Pelotas - RS e constataram em 100% (20/20) dos isolados a amplificação do gene *femA*, permitindo uma correta identificação do micro-organismo.

Apesar de o gene *femA* ser considerado um marcador essencial e específico para a identificação de *S. aureus*, devido a sua resistência à meticilina, esse gene não é uma região conservada somente nessa espécie. Estudos relatam a presença desse gene em algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes à meticilina (ALBORN, *et al.*, 1996; FERNANDÉZ *et al.*, 2004; UNAL *et al.*, 1992; VANNUFFEL *et al.*, 1999).

Alborn *et al.* (1996) pesquisaram a presença do gene *femA* em cepas padrões de *S. epidermidis* e *S. aureus* e observaram que a seqüência do gene *femA* encontrada na espécie coagulase negativa foi homóloga àquela encontrada em *S. aureus*.

Em outro estudo, Vannuffel *et al.* (1999) avaliaram, pela pesquisa do gene *femA*, as espécies *S. hominis* e *S. saprophyticus*, provenientes de cepas padrões e isolados clínicos e observaram que existe uma homologia na seqüência nucleotídica entre as espécies coagulase negativa e *S. aureus*, mostrando que o gene *femA* é uma região conservada no gênero *Staphylococcus*. Resultado semelhante foi encontrado por Moussallem *et al.* (2007) que pesquisaram o gene *femA* em cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, obtidas de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro e constataram em 40% (10/25) das cepas a amplificação de um fragmento de 132pb desse gene.

Veras *et al.*, (2008) avaliaram o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isolados de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, ocorridos no período de 1998 a 2002, no estado de Minas Gerais, e constataram em 27% (4/15) dos isolados coagulase negativa a amplificação do fragmento de 132pb do gene *femA*.

A técnica de Multiplex PCR pode ser definida como a amplificação simultânea de vários genes pelo uso de múltiplos pares de *primers* na mesma reação. Vários protocolos utilizando essa técnica estão sendo desenvolvidos e outros, já estão em pleno uso para a detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (ARCURI *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2007; KWON *et al.*, 2004; MONDAY; BOHACH, 1999; SHARMA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005).

Chen *et al.* (2004) detectaram genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *S. aureus* isolados de alimentos e de casos de intoxicação alimentar estafilocócica e constataram em 14,5% (8/55), das cepas provenientes das amostras envolvidas nos casos de intoxicação, a presença dos genes *seg*, *seh* ou *sei*. Com relação às amostras de alimentos foi observado em 17,3% (24/139), 4,3% (6/139) 1,4% (2/139), 2%

(3/139), 6,5% (9/139) e 0,7% (1/139), respectivamente, a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sei*, *seg* e *sed*.

Borges (2006) avaliou o potencial enterotoxigênico em cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas de leite cru, coalhada, câmara de maturação e queijo de Coalho e constatou em 37,5% (12/32) dos isolados a presença dos genes *sec* (11/12) seguido pelo *sea* (1/12). Dessas doze cepas, seis eram coagulase negativa, evidenciando alta frequência de cepas com potencial enterotoxigênico não produtoras de coagulase.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Identificar espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isolados de queijo de Coalho e avaliar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

#### 3. 2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar espécies de *Staphylococcus* contaminantes de queijo de Coalho através de testes bioquímicos;
- Pesquisar o gene *femA* em cepas de *Staphylococcus* pela técnica de PCR.;
- Identificar espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, pela detecção de genes codificadores de enterotoxinas por meio de multiplex PCR

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção e coleta das amostras

Foram analisadas 300 amostras de queijo de Coalho, provenientes de 15 marcas (sete artesanais e oito industriais), coletadas semanalmente no comércio varejista de Fortaleza-CE, no período de julho de 2007 a junho de 2008. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram realizadas as pesquisas para *Staphylococcus*, conforme metodologia descrita no Manual de Análises Bacteriológica da *Food and Drug Administration* (FDA) (BENNET; LANCET, 2001).

### 4.2. Isolamento de *Staphylococcus* sp.

Foram utilizadas alíquotas de 25g de cada amostra, retirada assepticamente e transferidas para frascos contendo 225mL de citrato de sódio 2%, a 50 °C, como diluente. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos, a 260rpm, em homogeneizador (Sewart; Stomacher<sup>®</sup> 400 Circulator) e submetidas às diluições seriadas até 10<sup>-6</sup>. De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 0,1mL para a superfície de placas de ágar Baird-Parker, em duplicata. Após incubação a 35 °C por 24-48 horas, foram selecionadas as placas contendo entre 20-200 colônias para contagem e coleta de colônias típicas (colônias circulares, pretas, pequenas, no máximo 1,5mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massas de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca) e /ou atípicas (colônias cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos) de *Staphylococcus* sp.

### 4.3. Identificação fenotípica de *Staphylococcus* sp.

As colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* sp. foram submetidas a testes bioquímicos convencionais para a confirmação do gênero. A partir dos resultados da confirmação, foram selecionadas colônias típicas e atípicas para identificação através do



sistema API<sup>®</sup>– STAPH. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC 12600 e como controle negativo *S. epidermidis* ATCC 14990.

#### **4.3.1. Identificação com base em testes bioquímicos convencionais**

A triagem prévia dos isolados de *Staphylococcus* foi realizada com base em testes bioquímicos convencionais descritos no Manual Analítico de Bacteriologia / FDA (BENNET; LANCETT, 2001).

##### **4.3.1.1. Ativação das culturas**

Cada colônia selecionada em ágar Baird–Parker foi inoculada em ágar de soja e tripticaseína inclinado e incubada a 35 °C por 24 horas e, decorrido esse período, armazenadas sob refrigeração.

##### **4.3.1.2. Coloração de gram**

Após o crescimento da cultura em ágar de soja e tripticaseína (TSA) inclinado, a 35 °C por 18-24 horas, foi preparado um esfregaço para coloração de Gram para a observação da morfologia das colônias. A forma de cocos gram-positivos é característica do gênero *Staphylococcus*.

##### **4.3.1.3. Produção de catalase**

Uma colônia crescida no ágar TSA, a 35 °C por 18-24 horas, foi transferida para uma lâmina de vidro e adicionado de 0,1mL de peróxido de hidrogênio 3% (v/v). A formação de borbulhamento imediato indica teste positivo e a ausência indica teste negativo.

##### **4.3.1.4. Produção de coagulase**

Cada uma das cinco colônias selecionadas de cada amostra foi inoculada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 35 °C por 18-24 horas. Após esse período,

foram transferidos 0,2 mL da cultura obtida para um tubo de ensaio, sendo, em seguida, adicionados 0,5 mL de plasma de coelho reconstituído com solução salina (0,85%) e misturados cuidadosamente. Os tubos foram incubados em banho-maria a 35 °C e observada a formação de coágulo, periodicamente, até seis horas de incubação. Foram consideradas como reações positivas a formação de coágulo nos níveis 3 ou 4. Isolados não produtores de coagulase também foram selecionados de todas as amostras.

#### **4.3.1.5. Produção de DNase**

Colônias crescidas em ágar TSA foram inoculadas em placas contendo ágar DNase e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após crescimento, verteu-se sobre cada uma, algumas gotas da solução de azul de toluidina 1% (p/v). Após alguns minutos, observou-se a formação de um halo transparente ao redor das colônias, indicando a produção da enzima DNase.

#### **4.3.1.6. Sensibilidade a lisostafina**

Após crescimento da cultura em caldo BHI, a 35 °C por 18-24 horas, alíquota de 0,1 mL da cultura foi transferida para tubo de ensaio e, em seguida, adicionada de 0,1 mL de lisostafina (25µg/mL) reconstituída em salina fosfatada tamponada (0,02M). Os tubos foram incubados a 35 °C por 2 horas e, após esse período, foi realizada a leitura. A perda de turbidez para essa mistura é considerada como reação positiva e, se a turbidez permanecer, a reação é considerada negativa.

#### **4.3.1.7. Utilização anaeróbica de glicose e manitol**

Uma alçada da cultura crescida em ágar TSA foi inoculada em caldo púrpura base com 0,5% de glicose e caldo púrpura base com 0,5% de manitol, previamente desaerados. Após inoculação, cada tubo foi coberto com uma camada de 2,5 mm de óleo mineral estéril e incubado a 37 °C por cinco dias. A viragem ácida do meio, representada pela coloração amarela, indicou reação positiva.

#### 4.4. Identificação pelo sistema API<sup>®</sup> - STAPH

A partir da triagem prévia, realizada com base nos resultados dos testes bioquímicos convencionais, foram obtidos 207 isolados de *Staphylococcus* sp., sendo 162 coagulase positiva e 46 coagulase negativa, para caracterização fenotípica a nível de espécie utilizando o sistema de identificação de *Staphylococcus* e *Micrococcus* API<sup>®</sup> – STAPH (BioMérieux S.A, Marcy-I'Etoile-France).

#### 4.5. Identificação Molecular

A técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada na detecção de genes específicos e de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em 95 cepas de *Staphylococcus* representativas dos 15 marcas de queijos envolvidas no estudo.

##### 4.5.1. Extração de DNA

As cepas de *Staphylococcus* sp. estudadas tiveram o seu material genético extraído segundo protocolo descrito por Rosec e Gigaud (2002), com algumas modificações.

Para extração do DNA foi utilizada uma colônia de cada isolado, crescida em caldo infusão de cérebro e coração a 35°C por 15-18 horas. 2 mL da cultura foi transferido para tubo *Eppendorf* e centrifugada (*Micro High Speed Refrigerated Centrifuge*; VS – 15000CFNII) a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas com 500 µL tampão TE [Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0] e centrifugadas a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, as células ressuspendidas com 200 µL tampão TE, adicionado de 15 µL de lisostafina 1 mg/mL (Sigma, L7386), agitadas (agitador tipo vortex) e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, 10 µL de proteinase K 20mg/mL (Sigma, P6556) foram adicionados, e as células foram incubadas a 60 °C por 20 minutos e depois a 100 °C por 10 minutos. O DNA total obtido foi congelado a -20 °C até o momento da amplificação por PCR.

As modificações realizadas nesse protocolo foram: a substituição da etapa de lavagem do pellet de células com solução de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–2H<sub>2</sub>O,) pH 7.4, em NaCl 0.9% pela lavagem com 500 µL de tampão TE; a adição de 10 U de lisostafina

(1mg/mL) por 15 µL de lisostafina (1mg/mL) e a adição de 5 µL de proteinase K (20mg/mL) por 10 µL de proteinase K (20mg/mL).

#### 4.5.2. Reação de polimerização em cadeia – PCR

##### 4.5.2.1. Primers

Nas reações de PCR foram utilizados *primers* específicos para o gene *femA* e para os genes codificadores de enterotoxinas, conforme pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a amplificação de gene específico para espécies de *Staphylococcus* e detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

Oligonucleotídeos (5' – 3')	Gene alvo	Produto amplificado	Referência
SEA <sub>1</sub> : ACG ATC AAT TTT TAC AGC SEA <sub>2</sub> : TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC	<i>sea</i>	544 pb	Betley; Mekalanos (1985)
SEB <sub>1</sub> : GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC SEB <sub>2</sub> : TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C	<i>seb</i>	416 pb	Jones; Khan (1986)
SEC <sub>1</sub> : GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT SEC <sub>2</sub> : AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA	<i>sec</i>	257 pb	Bohach; Schievert (1987)
SED <sub>1</sub> : TTA CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT SED <sub>2</sub> : CCA CCA TAA CAA TTA ATG C	<i>sed</i>	334 pb	Bayles; Iandolo (1989)
SEE <sub>1</sub> : ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA SEE <sub>2</sub> : TAA CTT ACC GTG GAC CC	<i>see</i>	170 pb	Couch et al. (1988)
SEG <sub>1</sub> : ACG TCT CCA CCT GTT GAA GG SEG <sub>2</sub> : TGA GCC AGT GTC TTG CTT TG	<i>seg</i>	400 pb	Munson et. al (1998)
SEH <sub>1</sub> : TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG SEH <sub>2</sub> : TAG CAC CAA TCA CCC TTT CC	<i>seh</i>	357 pb	Ren et al. (1994)
SEI <sub>1</sub> : TGG AAC AGG ACA AGC TGA AA SEI <sub>2</sub> : TAA AGT GGC CCC TCC ATA CA	<i>sei</i>	467 pb	Munson et al. (1998)
SEJ <sub>1</sub> : CAG CGA TAG CAA AAA TGA AAC A SEJ <sub>2</sub> : TCT AGC GGA ACA ACA GTT CTG A	<i>sej</i>	426 pb	Zhang et al. (1998)
SEL <sub>R</sub> : CTG TTT GAT GCT TGC CAT TG SEL <sub>F</sub> : CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	<i>sel</i>	240 pb	Cremsi et al. (2005)
FEMA <sub>1</sub> : AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG FEMA <sub>2</sub> : GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	<i>femA</i>	132 pb	Mehrotra et al. (2000)

#### 4.5.2.2. Condições da reação de PCR

A reação continha uma mistura de 5 µL de tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* (Alpha DNA) e 1,0 U Taq DNA Polimerase Recombinant (Invitrogen). A essa mistura foram adicionados 5 µL do DNA extraído e o volume foi completado para 50 µL com água destilada livre de DNase e RNase (Gibco).

A amplificação foi realizada em termociclador (Techne; TC 512) de acordo com as seguintes etapas: aquecimento a 94 °C por três minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos), extensão final a 72 °C por dez minutos e manutenção das amostras a 4 °C até a aplicação no gel (ROSEC; GIGAUD, 2002, com modificações).

Foram aplicados 14 µL dos produtos de PCR em gel de agarose (Amersham) (1,8%, p/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). Após corrida a 100V por 1 hora e 45 minutos em cuba de eletroforese (Fisher Biotech Electronic System; Large Horizontal System; FB - SB2025 Fisher Scientific), utilizando fonte estabilizadora de eletroforese (Fisher Scientific; SB300), a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transluminador (Vilber Lourmat; Super-Bright - Multi-Application) seguido do registro das imagens em foto documentador (Canon; Power Shot A620).

As modificações realizadas nesse protocolo de PCR foram: substituição de 30 ciclos de anelamento para 35 e inclusão das etapas de extensão final a 72 °C e manutenção dos produtos de PCR a 4 °C até aplicação no gel de agarose.

#### 4.5.2.3. Pesquisa do gene *femA* em cepas de *Staphylococcus*

As 40 cepas *Staphylococcus aureus*, sendo 20 cepas isoladas de queijos de Coalho artesanais e 20 de queijos de Coalho industriais, identificadas com base em provas bioquímicas convencionais e pelo sistema API<sup>®</sup> – STAPH, foram submetidas à confirmação genotípica pela amplificação de um fragmento de 132 pb para o gene *femA*. A pesquisa do gene *femA* foi também realizada em 55 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa identificados pelo sistema API<sup>®</sup> – STAPH. Como controle positivo da reação foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

#### **4.5.2.4. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa**

A pesquisa dos genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sel*) codificadores de enterotoxinas estafilocócicas foi realizada em 95 cepas de *Staphylococcus*, entre coagulase positiva (40) e negativa (55), selecionadas entre aquelas previamente identificadas pelo API<sup>®</sup>-STAPH, através da técnica de PCR e Multiplex PCR

Na Multiplex PCR foram empregadas quatro conformações (*sea+sed*), (*seb+sel*), (*sec+see*); (*seh+sei*), sendo realizada PCR simples para os genes *seg* e *sej*. Como controles positivos da reação foram utilizados: *S. aureus* 95-4776B para *sea*; *S. aureus* 91-2415D para *seb*; *S. aureus* ATCC 19095 para *sec*, *seh*, *sei*, *seg* e *sel*; *S. aureus* ATCC 23235 para *sed*, *seg*, *sei* e *sej*; *S. aureus* ATCC 27664 para *see*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de queijos de Coalho apresentaram elevada população de *Staphylococcus* sp. As contagens variaram de  $1,3 \times 10^6$  UFC/g a  $6,6 \times 10^9$  UFC/g nos queijos artesanais e  $1,3 \times 10^7$  UFC/g a  $2,9 \times 10^{10}$  UFC/g nos queijos industriais. Este nível de contaminação por *Staphylococcus* sp. é considerado alto e pode favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócicas sob condições ambientais (pH, temperatura, atividade de água, etc.) adequadas. Esta contaminação pode ser atribuída à prevalência de *S. aureus* na natureza e a não adoção das Boas Práticas de Fabricação desde a obtenção higiênica do leite até o produto final.

Elevadas contagens de *Staphylococcus* sp. também tem sido observada com frequência em estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo de Coalho. Lima (2005) avaliou amostras de queijo de Coalho comercializadas em Fortaleza-CE e observou a incidência de *Staphylococcus* sp. em 98,7% das amostras, cujas contagens variaram de  $6,0 \times 10^4$  a  $8,9 \times 10^7$  UFC/g. Resultado semelhante foi encontrado por Rapini *et al.* (2002) que avaliaram amostras de queijos de Coalho, comercializados nas praias de Salvador e Maceió, e constataram elevada população de *Staphylococcus* sp. ( $4,7 \times 10^4$  a  $2,0 \times 10^7$  UFC/g) em 100% das amostras.

Entre as 300 amostras de queijos analisadas, foram obtidos 327 isolados típicos de *Staphylococcus*, sendo 145 coagulase negativa e 182 coagulase positiva. Após triagem prévia com base em testes bioquímicos convencionais foram selecionados 207 isolados característicos do gênero.

Os resultados da identificação fenotípica, dos 207 isolados selecionados, pelo sistema API<sup>®</sup>-STAPH, podem ser observados na Tabelas 4 e 5.

A caracterização fenotípica (API – STAPH) possibilitou a identificação de 193 isolados (sendo 117 de queijos artesanais e 76 de queijos industriais) distribuídos em 14 espécies de *Staphylococcus*, sendo três coagulase positiva e 11 coagulase negativa. Houve prevalência das espécies *S. aureus* (106/193), *S. xylosus* (40/193), *S. cohnii spp. cohnii* (17/193), *S. saprophyticus* (6/193), *S. epidermidis* (4/193), *S. hyicus* (4/193), *S. lentus* (4/193), *S. sciuri* (4/193), *S. cohnii spp. urealyticus* (2/193), *S. haemolyticus* (2/193), *S. chromogenes* (1/193), *S. lugdunensis* (1/193), *S. hominis* (1/193) e *S. intermedius* (1/193). Entre essas espécies, foi constatada alta frequência de *S. aureus* (100%) nas amostras de queijo de Coalho artesanais e de *S. xylosus* (87,5%) e *S. cohnii spp. cohnii* (50%) nas amostras de queijo de Coalho industriais (Tabela 5).

**Tabela 4.** Perfil de espécies de *Staphylococcus* isoladas em diferentes amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de Queijo</b>	<b>Marca</b>	<b>Espécies identificadas (API-Staph -BioMérieux)</b>
<b>Artesanal</b>	A	<i>S. aureus</i> (5)*; <i>S. xylosus</i> (1); <i>S. saprophyticus</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (1); <i>S. chromogenes</i> (1)
	B	<i>S. xylosus</i> (1); <i>S. aureus</i> (8); <i>S. saprophyticus</i> (1); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (3); <i>S. haemolyticus</i> (1)
	C	<i>S. aureus</i> (8); <i>S. hominis</i> (1); <i>S. saprophyticus</i> (1); <i>S. cohnii ssp urealyticus</i> (1)
	D	<i>S. aureus</i> (16); <i>S. xylosus</i> (1); <i>S. lentus</i> (1); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (3); <i>S. saprophyticus</i> (1)
	E	<i>S. aureus</i> (14); <i>S. lugdunensis</i> (1); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (2); <i>S. epidermidis</i> (1)
	F	<i>S. aureus</i> (18); <i>S. hyicus</i> (4); <i>S. lentus</i> (1)
	G	<i>S. aureus</i> (18); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (1); <i>S. xylosus</i> (1)
<b>Industrial</b>	H	<i>S. xylosus</i> (5); <i>S. sciuri</i> (2); <i>S. haemolyticus</i> (1); <i>S. intermedius</i> (1);
	I	<i>S. xylosus</i> (4); <i>S. lentus</i> (1); <i>S. cohnii ssp urealyticus</i> (1)
	J	<i>S. lentus</i> (1); <i>S. sciuri</i> (2); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (2)
	L	<i>S. xylosus</i> (1); <i>S. aureus</i> (1); <i>S. epidermidis</i> (1); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (3)
	M	<i>S. xylosus</i> (17)
	N	<i>S. aureus</i> (8); <i>S. xylosus</i> (2); <i>S. saprophyticus</i> (1)
	O	<i>S. aureus</i> (10); <i>S. xylosus</i> (4); <i>S. epidermidis</i> (1); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (1); <i>S. saprophyticus</i> (1)
	P	<i>S. xylosus</i> (3); <i>S. cohnii ssp cohnii</i> (2)

\*Valores em parênteses indicam a quantidade de cepas identificadas para a espécie.

A alta frequência de *S. aureus* (100%) nas amostras de queijo de Coalho artesanais pode ser atribuída à contaminação do leite cru, a re-contaminação pós-pasteurização, a condições de armazenamento inadequadas e ao manipulador, o qual tem sido considerado uma importante fonte de disseminação desta bactéria em alimentos. É importante salientar que *S. aureus* tem se destacado como a principal espécie responsável por casos de



surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, devido à possibilidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas.

**Tabela 5.** Freqüência de espécies de *Staphylococcus*, identificadas pelo sistema API®-STAPH, nas amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de queijo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Freqüência (%)</b>
Artesanal	<i>S. aureus</i>	100
	<i>S. cohnii spp cohnii; S. saprophyticus; S. xylosus</i>	57
	<i>S. epidermidis; S. lentus</i>	28
	<i>S. cohnii spp urealyticus; S. hyicus; S. lugdunensis;</i> <i>S. haemolyticus; S. hominis; S chromogenes</i>	14
	Industrial	
Industrial	<i>S. xylosus</i>	87,5
	<i>S. cohnii spp cohnii</i>	50
	<i>S. aureus</i>	37,5
	<i>S. sciuri; S. lentus; S. epidermidis; S. saprophyticus</i>	25
	<i>S. cohnii spp urealyticus; S. haemolyticus;</i> <i>S. intermedius</i>	12,5

Borges (2006) observou que as espécies de *Staphylococcus* prevalentes em amostras de queijo de Coalho foram: *S. epidermidis* (37,5%), *S. xylosus* (25%), *S. aureus* (18,8%), *S. cohnii spp cohnii* (6,2%), *S. haemolyticus* (6,2%) e *S. lentus* (6,3%). Em outro estudo, Pinto *et al.* (2005) avaliaram 131 isolados, obtidos de alimentos comercializados da Espanha, e constataram em 58% das amostras avaliadas as seguintes espécies: *S. aureus* (56), *S. hominis* (1), *S. lentus* (1), *S. saprophyticus* (2), *S. warneri* (3), *S. xylosus* (3), *S. epidermidis* (3), *S. cohnii* (1), *S. sciuri* (4) e *S. chromogenes* (2). Resultado semelhante foi encontrado por De Luca *et al.* (1997) que isolaram 313 cepas de *Staphylococcus* sp. em 135 amostras de diferentes tipos de queijos e observaram que as espécies de maior ocorrência foram *S. epidermidis* (45,9%), *S. hominis* (42,2%), *S. xylosus* (44,4%) e *S. cohnii* (37,8%).

A alta frequência de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, tais como *S. xylosus*, *S. cohnii* spp *cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. lentus* detectada nas amostras de queijo de Coalho, demonstra a necessidade de uma reavaliação dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira, uma vez que a mesma estabelece, até o momento, padrões apenas para *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos.

Os resultados da identificação genotípica de para espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa podem ser observados nas tabelas 6 e 7. O resumo das informações obtidas sobre a pesquisa do gene *femA* em *Staphylococcus* spp. encontram-se na Tabela A.1 e B.1 e nas figuras de 1 a 5, que encontram-se nos apêndices A e B.

De 40 isolados de *S. aureus*, avaliados pela PCR, verificou-se a amplificação do fragmento de 132pb, específico para o gene *femA*, em 95% (38/40) das cepas avaliadas. Esse resultado evidencia maior especificidade e poder discriminatório da análise genética.

**Tabela 6.** Pesquisa do gene *femA* em *S. aureus* isolados de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de Queijo</b>	<b>N ° de isolados</b>	<b>Identificação API<sup>®</sup>-STAPH</b>	<b>Nº de isolados positivos para a pesquisa do gene <i>femA</i></b>
Artesanal	20	<i>S. aureus</i>	18
Industrial	20	<i>S. aureus</i>	20
<b>Total de cepas avaliadas</b>	<b>40</b>		<b>38</b>

Em outra pesquisa, Borges (2006) também identificou geneticamente cepas de *S. aureus* isoladas de queijo e da linha de produção de queijo de Coalho e, constatou a amplificação do gene *femA* em 82,6% (19/23) das cepas avaliadas. Em estudo semelhante, Zocche *et al.* (2007) avaliaram cepas de *S. aureus* isoladas de queijos Minas Frescal e detectaram a presença do gene *femA* em 100% (20/20) das cepas analisadas. Hassan *et al.*, (2008) avaliaram três marcadores moleculares, dentre eles, o *femA*, para a detecção de *S. aureus* e observaram nas 45 cepas avaliadas a amplificação para o gene.

A presença do gene *femA* também foi observada em 16,4% (9/55) das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, isoladas de queijo de Coalho artesanais (Tabela 7). Esse

resultado indica que o gene *femA* não é um marcador específico e universal encontrado somente em *S. aureus*, mas que é uma região conservada no gênero *Staphylococcus*.

**Tabela 7.** Pesquisa do gene *femA* em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de queijo</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>Identificação API®-STAPH</b>	<b>Nº cepas positivas para a pesquisa do gene <i>femA</i></b>
<b>Artesanal</b>	25	<i>S. saprophyticus</i> ; <i>S. chromogenes</i> ; <i>S. cohnii spp cohnii</i> ; <i>S. saprophyticus</i> ; <i>S. haemolyticus</i> ; <i>S. lugdunensis</i> ; <i>S. lentus</i>	9
<b>Industrial</b>	30	<i>S. xylosus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. sciuri</i> ; <i>S. cohnii spp urealyticus</i> ; <i>S. lentus</i> ; <i>S. cohnii spp cohnii</i>	0
<b>Total de cepas avaliadas</b>	<b>55</b>		<b>9</b>

Em contraste às pesquisas já realizadas, em que o gene *femA* tem sido considerado específico e universalmente presente em cepas de *S. aureus*, o mesmo, também, vem sendo estudado em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, pois é uma região conservada no gênero *Staphylococcus*, e que caracteriza a resistência a metilina das espécies (VANNUFFEL *et al.*, 1999).

Moussallem *et al.* (2007) realizaram a pesquisa do gene *femA*, em isolados *Staphylococcus* spp., obtidos de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro e observaram a amplificação de um fragmento de 132pb do gene em 40% (10/25) das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa. Em outro estudo, Veras *et al.* (2008) avaliaram cepas de *Staphylococcus*, isoladas de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica e constataram a presença do gene *femA* em 27% (4/15) das cepas coagulase negativa. Enquanto Unal *et al.* (1992) não detectaram a presença do gene *femA* nas cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a metilina.

Os resultados para a pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em *Staphylococcus* spp., isolados das amostras de queijos de Coalho artesanal

e industrial são apresentados na Tabela 8 e 9. O resumo das informações obtidas encontra-se na Tabela C.1, C.2 e nas figuras de 6 a 12 do apêndice C.

A presença de genes codificadores de enterotoxinas foi observada em 49,5% (47/95) das cepas avaliadas. Entre as 47 cepas que apresentaram genes codificadores para as enterotoxinas SEG e SEH, constatou-se a prevalência do gene *seh* em 53,2% (25/47) dos isolados, sendo nove de queijos artesanais e 16 de queijos industriais. O gene *seg* foi detectado em 46,8% (22/47) dos isolados, sendo 11 para cada tipo de queijo. Os genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEI, SEJ e SEL, não foram detectados nos isolados estudados. Esses resultados indicam que a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp, isolados de queijos de Coalho, foi pouco diversificada.

**Tabela 8.** Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *Staphylococcus* isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de Queijo</b>	<b>Quantidade de cepas</b>	<b>Coagulase</b>	<b>Genes Amplificados</b>
<b>Artesanal</b>	20	+	<i>seg</i> (2) <i>seh</i> (5)
	25	-	<i>seg</i> (9) <i>seh</i> (4)
<b>Industrial</b>	20	+	<i>seg</i> (2) <i>seh</i> (15)
	30	-	<i>seg</i> (9) <i>seh</i> (1)
<b>Total de cepas avaliadas</b>	<b>95</b>		<b>47</b>

\* Valores entre parênteses indicam a quantidade de cepas que amplificaram um dos genes.

Entre as espécies coagulase negativa com potencial enterotoxigênico que amplificaram um fragmento para os genes *seg* e *seh* podemos destacar: *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. cohnii* spp. *urealyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (Tabela 9). A presença de espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em amostras de queijo de Coalho, tanto artesanal quanto

industrial, pode representar um perigo em potencial à saúde pela possibilidade de causar intoxicação alimentar estafilocócica aos consumidores.

**Tabela 9.** Ocorrência dos genes *seg* e *seh* em *Staphylococcus* spp. isolados em diferentes amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de queijo</b>	<b>Marca</b>	<b>Espécies</b>	<b>Gene amplificado</b>
<b>Artesanal</b>	A	<i>S. chromogenes</i> (1)*, <i>S. epidermidis</i> (1), <i>S. saprophyticus</i> (1)	3 <i>seh</i>
	B	<i>S. aureus</i> (1)	1 <i>seg</i>
	C	<i>S. cohnii ssp urealyticus</i> (1), <i>S. hominis</i> (1), <i>S. saprophyticus</i> (1)	3 <i>seh</i>
	D	<i>S. cohnii ssp cohnii</i> (2), <i>S. lentus</i> (1), <i>S. saprophyticus</i> (1), <i>S. xylosus</i> (1)	5 <i>seg</i>
		<i>S. aureus</i> (1)	1 <i>seh</i>
	E	<i>S. cohnii ssp cohnii</i> (1), <i>S. epidermidis</i> (1), <i>S. lugdunensis</i> (1) <i>S. aureus</i> (1)	3 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
F	<i>S. aureus</i> (1), <i>S. hyicus</i> (1)	2 <i>seg</i>	
	<i>S. aureus</i> (1)	1 <i>seh</i>	
<b>Industrial</b>	H	<i>S. xylosus</i> (4)	4 <i>seg</i>
	I	<i>S. xylosus</i> (3), <i>S. lentus</i> (2)	5 <i>seg</i>
		<i>S. xylosus</i> (1)	1 <i>seh</i>
	J	<i>S. lentus</i> (1)	1 <i>seg</i>
		<i>S. cohnii spp cohnii</i> (1)	1 <i>seh</i>
	L	<i>S. aureus</i> (2)	1 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
		N	<i>S. aureus</i> (3)
O	<i>S. aureus</i> (10)	10 <i>seh</i>	

\* Valores em parênteses indicam a quantidade de cepas da espécie que amplificaram um fragmento para o gene.

Rosec e Gigaud (2002) detectaram genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*) codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em cepas de *Staphylococcus* provenientes de alimentos comercializados na França e constataram a prevalência dos genes *seg* e *seh* em 81% (52/155) das cepas. Em outro estudo, Chen *et al.* (2004) pesquisaram genes (*seg*, *seh* e *sei*) codificadores de enterotoxinas em cepas de *S. aureus*, isoladas de alimentos, e observaram a presença de um desses genes em 9,3% (13/139) das cepas avaliadas.

Freitas (2006) pesquisou em cepas *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, isolados de queijo de Coalho, comercializados em Pernambuco, genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas e detectou a presença dos seguintes genes *tst* (1/18), *sec* (2/18), *sed* (2/18), *seg* (4/18), *seh* (3/18), *sei* (4/18) e *sej* (2/18) em 90% (18/20) das cepas.

Borges (2006) também pesquisou genes (*sea* a *see*; *sei* e *sej*) codificadores de enterotoxinas em 32 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, isoladas em uma linha de produção de queijo de Coalho e constatou a presença dos genes *sea* e *sec* em 12 cepas. O gene *sec* foi detectado em 91,7% das cepas positivas (11/12), incluindo cepas coagulase positiva e negativa, enquanto o gene *sea* foi constatado em uma cepa coagulase negativa.

Kérouanton *et al.* (2007) avaliaram o potencial enterotoxigênico de cepas de *S. aureus* associadas a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica na França e constataram em 29 cepas a presença de um ou mais dos genes estudados. Houve a prevalência do gene *sea* (23/29) e *sed* (12/29). Em outro estudo, Luz (2008) detectou em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite e queijo de Coalho, a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 93,6% das cepas avaliadas.

Esses resultados indicam que cepas de *Staphylococcus* enterotoxigênicos encontradas em alimentos requerem uma maior atenção por colocar em risco a segurança alimentar. Entretanto, a alta frequência de genes codificadores de enterotoxinas, provenientes de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, detectados nas amostras de queijo de Coalho, representa um risco de causar intoxicação alimentar estafilocócica aos consumidores.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi realizada a identificação bioquímica, molecular e avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus*, isolados de amostras de queijo de Coalho artesanais e industriais. Os resultados observados permitiram chegar às seguintes conclusões:

- O perfil de espécies de *Staphylococcus* contaminantes do queijo de Coalho é representado por espécies coagulase positiva e negativa com destaque para *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. cohnii* spp. *urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. intermedius*.
- Em queijo de Coalho artesanal observa-se alta frequência de *Staphylococcus* coagulase positiva, com prevalência de *S. aureus*. Enquanto que, para o queijo industrial, verifica-se maior frequência de espécies coagulase negativa, com predominância de *S. xylosus*, *S. cohnii* spp. *cohnii*.
- A identificação genotípica (PCR) confirmou 95% das cepas de *S. aureus* identificadas por meio de testes bioquímicos, demonstrando maior especificidade e poder discriminatório da análise molecular.
- As espécies coagulase negativa, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. lentus* e *S. lugdunensis*, apresentam o gene *femA*, indicando que esse gene é uma região conservada no gênero *Staphylococcus*.
- Os genes *seg* e *seh*, codificadores das novas enterotoxinas (SEG e SEH), ocorrem em espécies de *Staphylococcus* isolados de queijo de Coalho. O gene *seg* predominou em espécies coagulase negativa, tais como: *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. cohnii* spp. *urealyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*. Enquanto que o gene *seh* predominou em *S. aureus*.
- A alta frequência de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, detectada nas amostras de queijo de Coalho, sugere a necessidade de uma reavaliação dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para queijos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINEDEN O; HASSAN, A.A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER. E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goat's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 211-216, Mar., 2008.
- ALBORN W. E.; JR.; HOSKINS, J.; ONAL, S.; FLOKOWITSCH, J. E.; HAYES, C. A.; DOTZLAF, J. E.; YEH, W.K.; SKATRUD, P. L. Cloning and characterization of *femA* and *femB* from *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Genes and Genomes**, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 177-181, Nov., 1996.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, ANTONIO. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 34, n. 6, p.578-580, Dez., 2000.
- ALMEIDA, M. E.; SERAFIM, R. C.; EÇA, L. P. M.. Apresentação de algumas técnicas utilizadas na Biologia Molecular. In Lilian Piñero Eça e colaboradores. **Biologia molecular – guia prático e didático**. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. 11 p. 145 – 176.
- ANDRADE, A. A. **Estudo do Perfil Sensorial, Físico-Químico e Aceitação de Queijo de Coalho Produzido no Estado do Ceará**. 2006, 138f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S.. Técnicas básicas de biologia molecular. **Apostila**. Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1-57, 2004.
- AQUINO, F. T. M. **Produção de queijo de Coalho no estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**. 1983. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.
- ARCURI, E. F.; PAULA, G. B.; BORGES; M. F; ANGELO: F. F.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; PCR multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE. **Anais**. Goiânia. 2006. p. 1-3.
- ASAO, T. ; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**. Cambridge, v. 130, p. 33-40, Fev. 2003.



AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**, Columbus, v. 6, n. 6, p. 1474-1480, June, 1967.

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

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

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive *Cocci* that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington: ASM, 2003. v. 1, Chap. 28, p. 384-404.

BARBOSA, S. S.; TRAJANO, H.M. R.; MORATORI, M. C. S.; LIMA, F. L. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, procedência e condições de higiene em que são comercializados o queijo de Coalho na cidade de Teresina – Piauí. In: Reunião Anual da SBPC, 57, Fortaleza. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**, Fortaleza, Jul., 2005

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

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, and Toxic Shock Syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, Set., 1998.

BENSON, T. E.; PRINCE, D. B.; MUTCHLER, V. T.; CURRY, K. A.; HO, A. M.; SARVER, R. W.; HAGADORN, J. C.; CHOI, G. H.; GARLICK, R. L. X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus* FemA. **Structure**, London, v. 10, n. 8, p. 1107-1115, Aug., 2002.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Food Drug Administration (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8rd ed. Gaithersburg: AOAC International, 2001. Chap. 12. p. 12.1-12.5. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em 01.02.2007

BERGDOLL, M. S.; SURGALA, J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 334-338, Mar., 1959.

BERGDOLL, M. S.; HUANG, I. Y.; SCHANTZ, E.J. Chemistry of the Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v. 22, n 1, p. 9-13, Jan., 1974.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R.; WEISS, K. F. Identification enterotoxin E. **Infection and Immunity**, Washington, v. 4, n. 5, p. 593-593, Nov., 1971.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 90, n. 5, p. 1481-1485, Nov., 1965.

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, p. 1-35, n.1, Jan., 1992.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 1, p. 34--41, Jan., 1988.

BHATIA, A; ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A Review. **Journal Of Clinical and Diagnostic Research**. Delhi, v.1, n2 p. 188-197, Abr., 2007.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, May, 2004.

BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M.C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird Parker em queijos maturados. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, v. 20, n.2, p. 347-354, Jul./Dez., 2002.

BOHACH, G. A.; SCHIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C<sub>1</sub> gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 15-20, Aug., 1987.

BORELLI, E. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I.C.A.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra chesse, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Sao Paulo, v. 37, n. 4, p. 545-550, Out., 2006.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de Coalho. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.5, p. 1431- 1438, Ago., 2008.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de Coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 2005, 222f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, É.H.F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Micro-organismos patogênicos e indicadores em queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 21, nº 1, p. 31-40, Jan./Jun., 2003.

BORJA, C. R.; BERGDOLL, M. S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. **Biochemistry**, Columbus, v. 6, n. 5, p. 1467-1473, May, 1967.

BRASIL. **Instrução Normativa n.º30** de 26 de julho de 2001. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra, queijo de Coalho e queijo manteiga. Secretaria da defesa Agropecuária (DAS). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/indtnorm.html>>. Acesso em 01.02. 2007.

BRASIL. Agencia Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa. **Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001**. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Ministério Da Saúde. Disponível em: [http:// e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144). Acesso em 18.01.2009.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG. **Os queijos na fazenda**. 3 ed. São Paulo. Ed. Globo, 1989. Coleção do Agricultor – Laticínios. 219p.

BRETT, M. M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, London, v. 84, n. S1, p. 110S-118S, Jul., 1998.

CAMACHO, N. N.; MARINI, P.; ARMAS, R. D. DE; RIBEIRO, G. A.; TESSMANN, C. DETERMINAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E DE INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS EM AMOSTRAS DE QUEIJO RALADO. In: Congresso de Iniciação Científica, 16, Pelotas, 2007. **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica**, Universidade Federal de Pelotas, 4f., Nov., 2007

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

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 200. 182f. Tese. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid latic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. Nova York, v. 28, n. 4, p.281-370, Dez., 2002.

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

CASTELO BRANCO, M. A. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Ceppa**. V. 21, n. 2, p. 393-408, Jul/Dez, 2003.

CEARÁ (Estado). Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Epidemiologia. Célula de Vigilância Epidemiológica. **Informe anual de surtos das doenças transmitidas por alimentos**. Fortaleza, 2004. 4p.

CHEN, T. R, CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 189-197, Abr., 2004.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 66-73, Jan., 2008.

CHIANG, Y. C.; CHANG, L. T.; LIN, C. W.; YANG, C. E.; TSEN, H. Y. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L and M survey of staphylococcal enterotoxina types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning in Taiwan. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 69, n. 5, p 1072-1079, Mai., 2006.

COUCH, SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 7, p. 2954-2960, July, 1988.

CREMONESI, P.; PEREZE, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M; CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letter in Applied Microbiology**. Oxford, v 45, n 6, p. 586-591, Out., 2007.

CREMONESI, P.; VIMERCATI, C.; CASTIGLIONI, B.; LUZZANA, M.; RUFFO, G. Identification of enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and caprine milk. **Veterinary Research Communications**. v 30, n 3, p 241-243, Ago., 2006.

CUNHA, M. L. R. S; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O; JUNIOR, J.P.A. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, n. 1, p 70-74, Jan/Mar., 2006

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STANFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, Set/Dez., 2002.

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

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 267-270, Apr., 1997.

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

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria Monocytogenes* e micro-

organismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de Coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, Jul./Set., 2005.

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

FEITOSA, T. **Estudos tecnológicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do queijo de Coalho do estado do Ceará**. 1984, 96f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências, Fortaleza, 1984.

FERNANDÉZ, G. M.; MARRERO, A.; PIQUÉ, S. G.; CASTELLANOS, R. G.; GOMIS-RUTH, F. X. *Staphylococcal* methicillin resistance: fine focus on folds and functions. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 235, n.1, p. 1-8, Jun., 2004.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan., 2001.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do "queijo de Coalho" produzido no Estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 59, n. 13 p. 43-48, Jan. - Fev., 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bad Bug Book**. *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em 24.02.2007.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 5. p. 54-97.  
FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo, Editora Atheneu, 2004, cap. 4, p. 33-81.

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

FREITAS, M.F.L. **Caracterização fenotípica e genotípica de Staphylococcus spp isolados de queijo de Coalho e leite de vacas com mastite no estado de Pernambuco, Brasil.** 2006, 219f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2nd ed., 2004. Disponível em: <[http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline\\_5\\_2004.pdf](http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf)>  
Visualizado em : 15.01.2007

GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG. **Horizonte Científico.** Minas Gerais, v.1, n.7, p.1-18, Jul., 2007.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, Dez., 1997.

HASSAN, S. R. U.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Food Microbiology.** Amsterdam, v. 25, n. 3 p. 452-459, Mai., 2008.

HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dog, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, Utrecht, v. 45, n. 1, p. 11-17, Jan., 1995.

HOLECKOVÁ, B.; KALINACOVÁ, V.; GONDOL, J; FOTTA, M.; HOLODA, E.; BELICKOVÁ, E. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. **Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy.** Polônia, v. 48, p. 41-45, 2004.

HWANG, S. Y.; KIM, S. H; JANG, E. J.; KWON, N.H.; PARK, H. K.; JUNG, W. K.; KIM, J.M.; PARK, Y. H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 99-105, Jan., 2007.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Staphylococcus aureus*. In: ICMSF. (Ed). **Microorganisms in food 5: characterization of microbial pathogens.** New York: Kluvers Academic, 1996. v. 5, Chap. 17, p. 299-333.

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS Y ZOONOSIS (INPPAZ) / ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUDE (OMS). Vigilancia Epidemiológica. Sistema de información

regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>>. Acesso em: 02.01.2009.

JABLONSKI, L. M. ; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington: ASM, 2001. Chap. 19, p. 411-434.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan., 2001.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 166, n. 1, p. 20-33, Apr., 1986.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267-272, Nov., 2005.

KÉROUANTON, A. HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C. ; PETIT, L. ; CHESNEAU, O. ; BRISABOIS, A. ; DE BUYSER, M. L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 369-375, Abr., 2007.

KODJO, A.; NOEL, Y.; MAZEROLLES, G.; MAURIN, F.; BORGES, E.; BEUVIER, E.; CHAMBA, J.F. ; VILLARD, L. ; LAMPRELL, H. Identification and byotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their *in vitro* ability to produce enterotoxins. **Reveu Médecine Vétérinaire**. França, v. 155, n. 2, p. 92-96, 2004.

KURODA, M.; et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, London, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240, Abr., 2001.

KWON, N. H.; KIM, S. H.; PARK, K. T.; BAE, W. K.; KIM, J. Y.; LIM, J. Y.; AHN, J.S.; LYOO, K. S.; KIM, J.M; JUNG, W.K.; NOH, K. M. ; BOHACH, G. A. ; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 137-145, Dez., 2004.



LECLERC, V.; DUFOUR B.; LOMBARD B.; GAUCHARD F.; GARIN-BASTUJI B.; SALVAT G.; BRISABOIS A.; POUMEYROL M.; DE BUYSER M.-L.; GNANOU-BESSE N.; LAHELLEC C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Paris, v. 76, n. 3, p. 195-202, Set., 2002.

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

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Molecular and Cellular Probes**. Amsterdam, v. 17 n.4, p 139-147, Ago., 2003.

LIMA, A. F. ***Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de Coalho***. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 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.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de Coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco**. 2008, 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.

MACHADO, T. F.; VASCONCELOS, N. M.; LIMA, C. P.; ANDRADE, A. P. C.; BRITO, J. R. F. Patógenos prevalentes no queijo de Coalho. In: Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos, 19, Venezuela, 2007. **Anais do XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos**, p. 38, Mai., 2007.

MARTIN, M. C.; FUEYO, J.M.; GONZÁLEZ – 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**. Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 279-286, Ago., 2004.

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

MEYRAND, A.; FOLIO, P.; GIRAUDON, N.; HADJ-AMAR, D.; CAVAUD, M.C.; REYNAUD, A.; VERNIZY ROZAND, C. Comparaison d'une nouvelle technique d'extraction-concentration des entérotoxines staphylococciques par rapport à la méthode de référence dans les produits laitiers. **Reveu Médecine Vétérinaire**. França, v. 3, p 205-211, Mar., 2000.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of Multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3411-3414, Out., 1999

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from Milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**. Shannon, v. 124, n. 1-2, p. 66-72, Set., 2007.

MOUSSALLEM, B.C.; KURY, C. M. H.; MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**. Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 2-9, Nov., 2007.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T. ; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization staphylococcal enterotoxins of type G and from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3337-3348, July, 1998.

MURRU, N.; KODJO, A.; VILLARD, L.; FRATINO, L.; PERRELLI, G.; TOZZI, M.; CORTESI, M. L. Identification of coagulase negative Staphylococci isolated from dairy products using molecular methods. **Reveu Médecine Vétérinaire**. França, v. 156, p 455-459, Set., 2005.

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

NORMANNO, G.; FIRUNU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G.V. Coagulase – positive Staphylococci and

*Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, Jan., 2005.

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

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 6088-6094, June, 2003

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

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 2916--2919, Feb., 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. I.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 3, p. 360-366, Mar., 2001.

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, Out., 1999.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, n.2, p 171-175, Maio – Agosto, 2001.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Sistematic and Applied Microbiology**. Amsterdam, v. 28, n.5, p. 340-352, Jul., 2005

POWLEDGE, T. M. The Polymerase Chain Reaction. In: **Breakthroughs in Bioscience**. Disponível em: <http://opa.faseb.org/pdf/The%20Polymerase%20Chain%20Reaction.pdf>. Visualizado em: 09.01.2009.

RALL, V.M.L.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES JR, A.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G; ARAUJO JR, J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. Shannon, v. 132, n. 3-4, p. 408-413, Dez., 2008.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J. B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo Coalho. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-65, jul./ago., 2002

REISER, R. F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G.P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C<sub>3</sub>. **Infection and Immunity**, Washington, v. 45, n. 3, p. 625-630, Sept., 1984.

REN, K.; BANNAN, J. D.; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A. L.; ROBBINS, J. C.; FISCHETTI, V. A.; ZABRISKIE, J. B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin, **The Journal Experimental of Medicine**, New York, v. 180, n. 5, p. 1675-1683, Nov., 1994.

RIBEIRO, J. A. Queijos do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**. Juiz de Fora, v. 86, n. 15, p. 33-34, 1959.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Jan/Fev., 2002.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, Abr/Jun., 2006.

SANTOS, M. T. M. **Efeito do tratamento térmico do leite na qualidade do queijo Minas**. 1990. 52f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C.R. Development of a single-reaction Multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, Abr., 2000.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**. Shannon, v. 106, n. 1-2, p. 103-107, Abr., 2005.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p.1438-1443, Abr., 1995.

UNAL, S.; HOSKINS, J.; FLOKOWITSCH, J. E.; ERNIE WU, C.Y. PRESTON, D.A.; SKATRUD P. L. Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Using the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 30, n. 7 p. 1685-1691, Jul., 1992.

VANUFFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOUYER, M.; VANDERCAM, B.; PHILIPPE, M.; GALA, J-L. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Research in Microbiology**. Paris, v. 150, n. 2, p. 129-141, Mar., 1999.

VERAS, J. F.; CARMI, L.S.; TONG, L. C.; SHUPP, J.W. ; CUMMINGS, C. ; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. Amsterdam, v. 12, n 4, p 410-415, Jul., 2008.

VERNOZY-ROZAND, C. MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C.; RICHARD, Y. Improvement of a concentration protocol based on trichloroacetic acid for extracting staphylococcal enterotoxins in dairy products. **Reveu Médecine Vétérinaire**. França, v. 155, n. 11, p 533-537, 2004.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and Expression Analysis of *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13138-13147, April, 2002

ZELL, C. RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GOTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n.3, p. 246-251, Out., 2008.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 227 -233, Nov., 1998.

ZOCHE, F.; BASTOS, C. P.; FRANÇA, R. C.; SILVA, W. P. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijo tipo Minas Frescal: detecção Por PCR. **Anais**. XIX Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas, 2007.



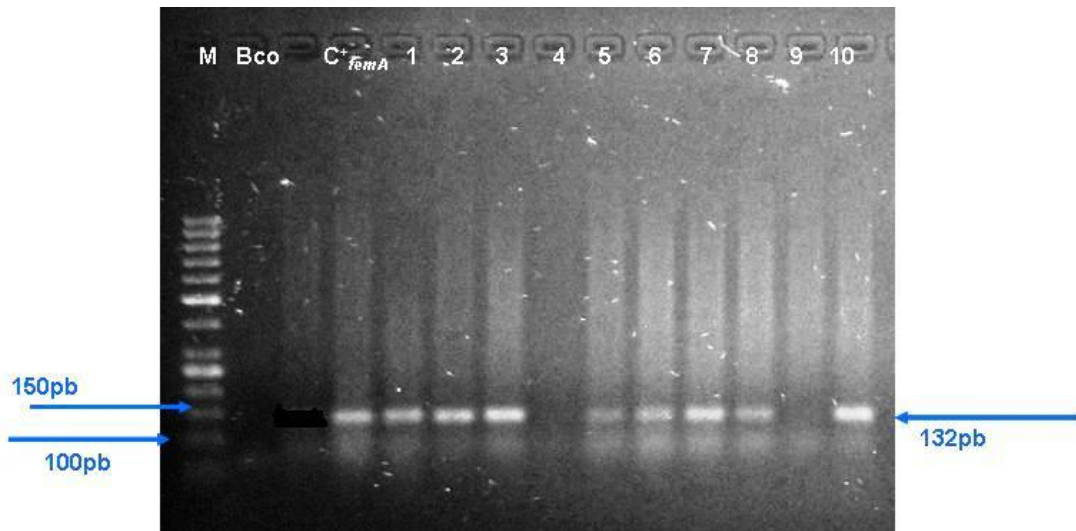


Figura A.1. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 10 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho artesanal; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas).

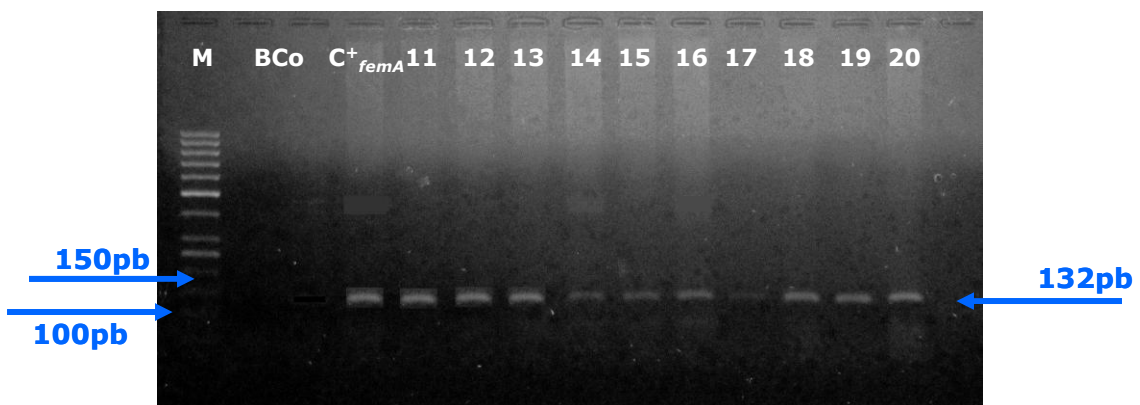


Figura A.2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 11 a 20 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho artesanal; C<sup>+</sup><sub>femA</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Bco: controle negativo da reação; M: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas).



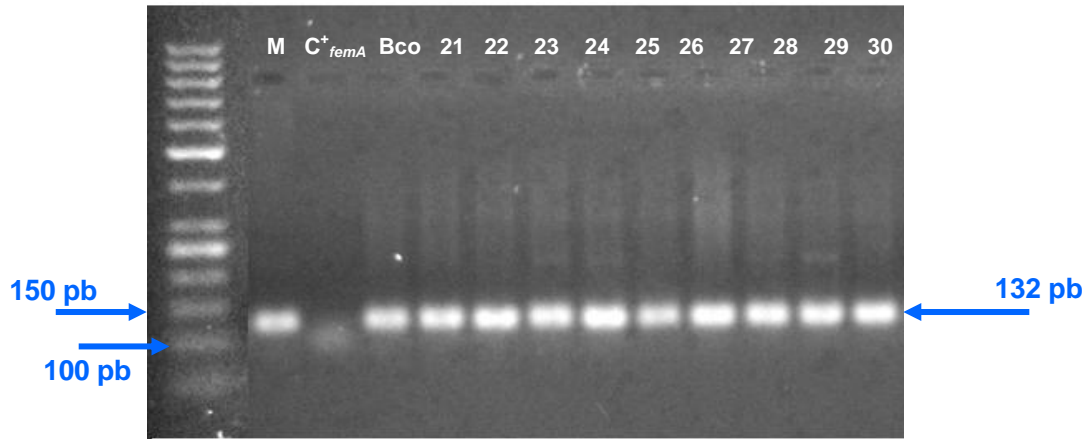


Figura A.3. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 21 a 30 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho industrial; *C*<sup>+</sup><sub>*femA*</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); *Bco*: controle negativo da reação; *M*: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas).

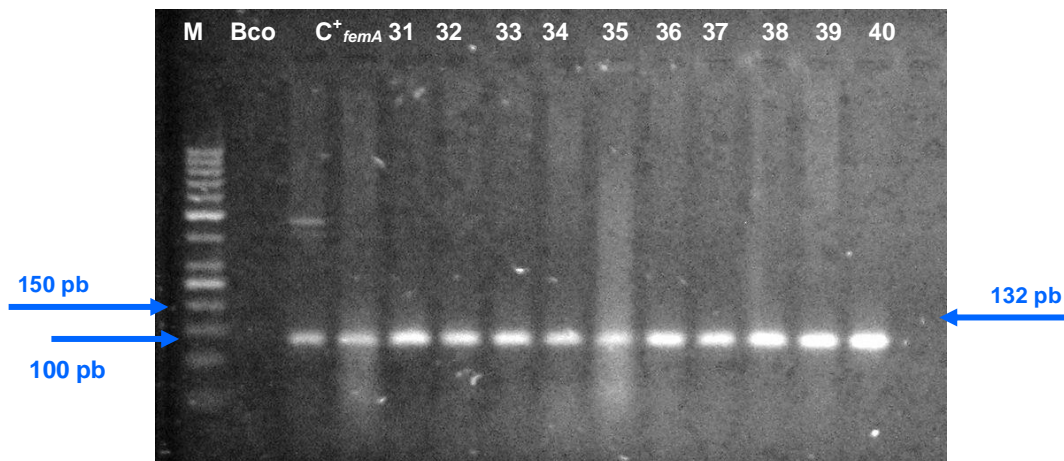


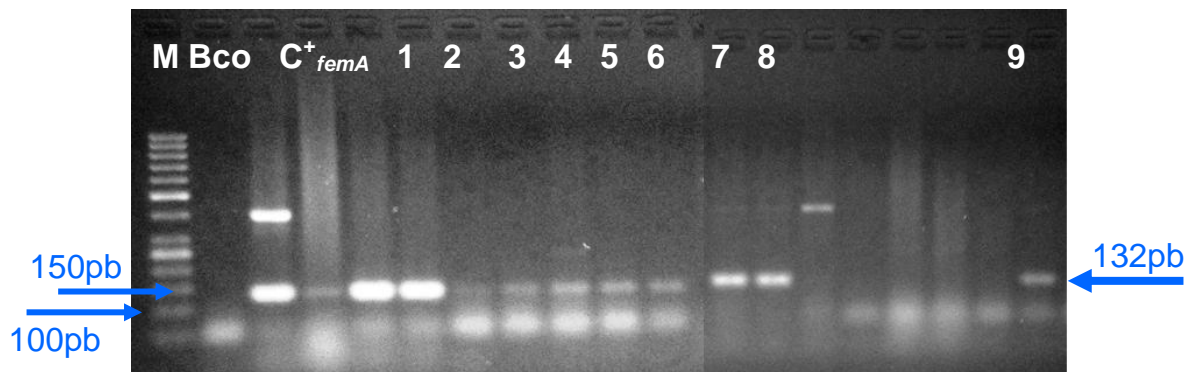
Figura A. 4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *femA*<sub>1</sub> e *femA*<sub>2</sub> para o gene *femA* em isolados *S. aureus*. Poços 31 a 40 positivos para *S. aureus* isolados de queijo de Coalho industrial; *C*<sup>+</sup><sub>*femA*</sub>: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); *Bco*: controle negativo da reação; *M*: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas).

## APÊNDICE B

### B.1. Pesquisa do gene *femA* em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas em amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial.

**Tabela B.1.** Pesquisa do gene *femA* para isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Tipo de queijo	Identificação API	PCR gene <i>femA</i>
Artesanal	<i>S. saprophyticus</i>	Positiva
	<i>S. chromogenes</i>	Positiva
	<i>S. cohnii spp cohnii</i>	Positiva
	<i>S. saprophyticus</i>	Positiva
	<i>S. cohnii spp cohnii</i>	Positiva
	<i>S. haemolyticus</i>	Positiva
	<i>S. lugdunensis</i>	Positiva
	<i>S. cohnii spp cohnii</i>	Positiva
	<i>S. lentus</i>	Positiva



**Figura B.1.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers femA<sub>1</sub>* e *femA<sub>2</sub>* para o gene *femA* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa. Poços de 1 a 9 positivos para o gene *femA* em *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijo de Coalho artesanal; *C<sub>femA</sub><sup>+</sup>*: controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923); *Bco*: controle negativo da reação; *M*: marcador de peso molecular 50pb (Fermentas).

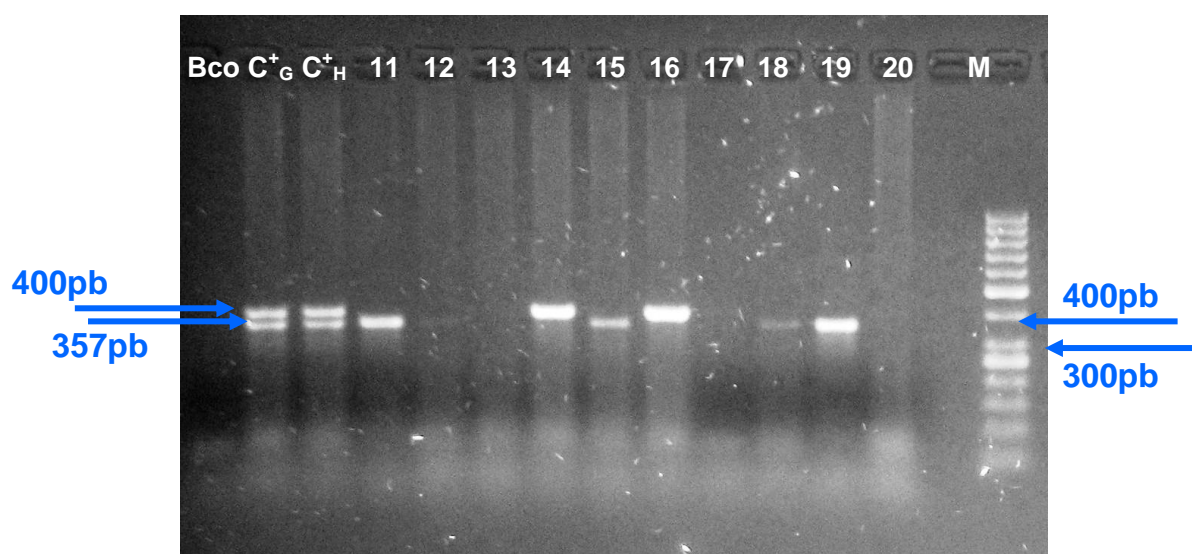
## APÊNDICE C

### C.1 Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em *Staphylococcus* spp., isolados das amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial.

**Tabela C.1.** Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de queijo de Coalho artesanal e industrial.

Tipo de Queijo	Espécies	Coagulase	Gene
Artesanal	<i>S. aureus</i>	+	<i>seg</i> (2)*
			<i>seh</i> (5)
	<i>S. hyicus</i> ; <i>S. saprophyticus</i> ; <i>S. lugdunensis</i> ; <i>S. lentus</i> ; <i>S. chromogenes</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. xylosus</i> ; <i>S. haemolyticus</i> ; <i>S. hominis</i> ; <i>S. cohnii ssp cohnii</i>	-	<i>seg</i> (9)
			<i>seh</i> (4)
Industrial	<i>S. aureus</i>	+	<i>seg</i> (2)
			<i>seh</i> (15)
	<i>S. xylosus</i> ; <i>S. sciuri</i> ; <i>S. cohnii ssp</i> <i>urealyticus</i> ; <i>S. cohnii ssp cohnii</i> ; <i>S. lentus</i> ; <i>S. epidermidis</i>	-	<i>seg</i> (9)
			<i>seh</i> (1)

\* Valores entre parênteses expressam a quantidade de cepas das espécies identificadas que amplificaram o gene.



**Figura C.1.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh*, em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 11, 12, 15, 18 e 19 isolados positivos para *seh*; amostras 14 e 16 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub>: controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095); C<sup>+</sup><sub>H</sub>: controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

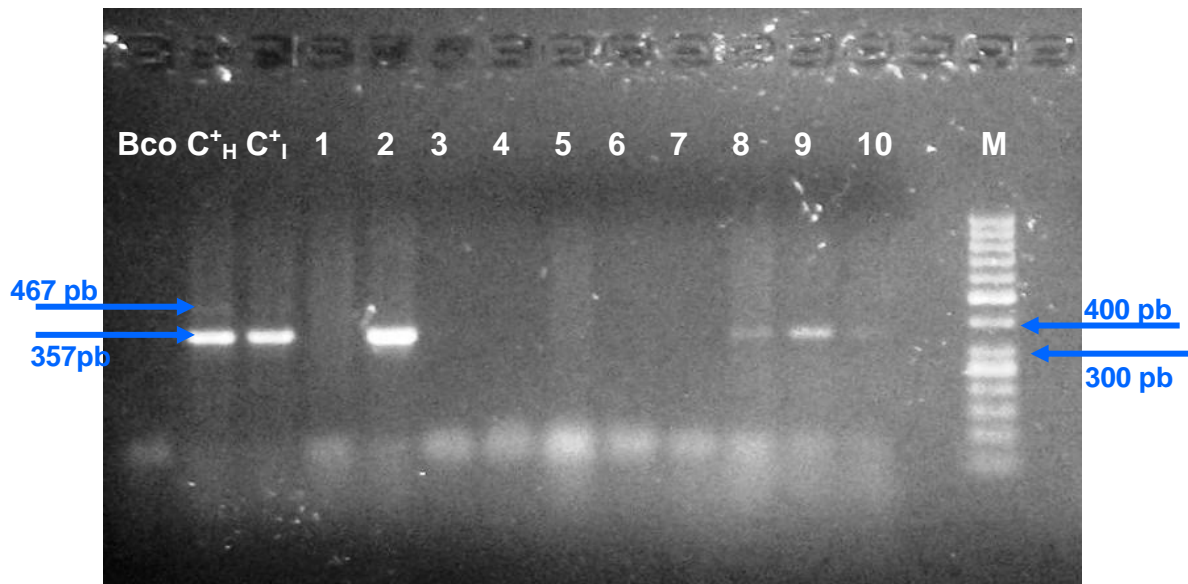


Figura C.2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *sei*<sub>1</sub>/*sei*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *sei* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 2, 8, 9 e 10 isolados positivos para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>I</sub>: controle positivo para *sei* (*S. aureus* ATCC 19095); C<sup>+</sup><sub>H</sub>: controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas)

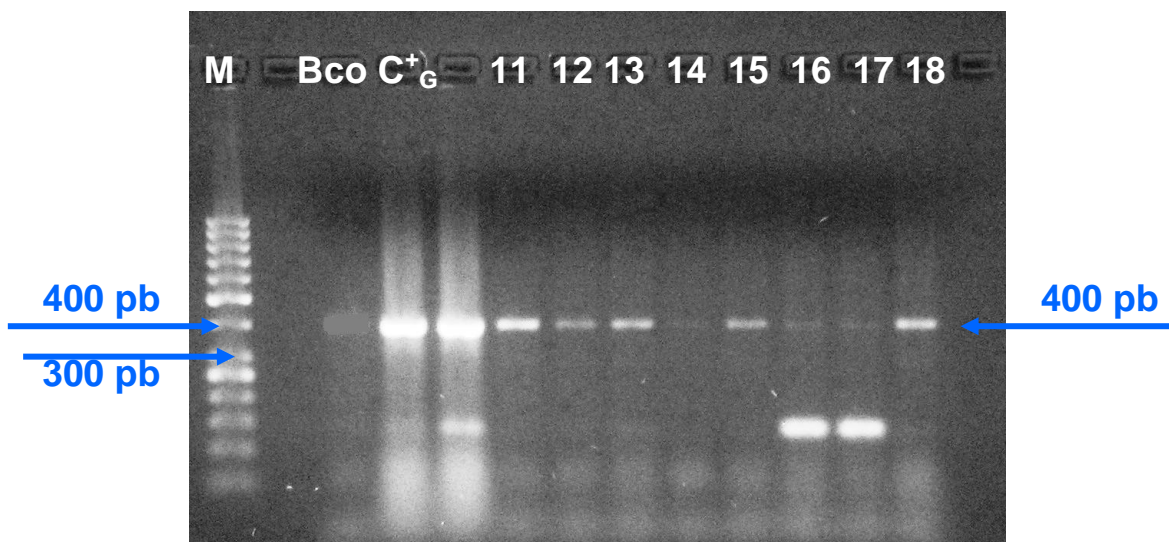


Figura C.3. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub>, para o gene *seg* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho artesanal. Amostras 11 a 18 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

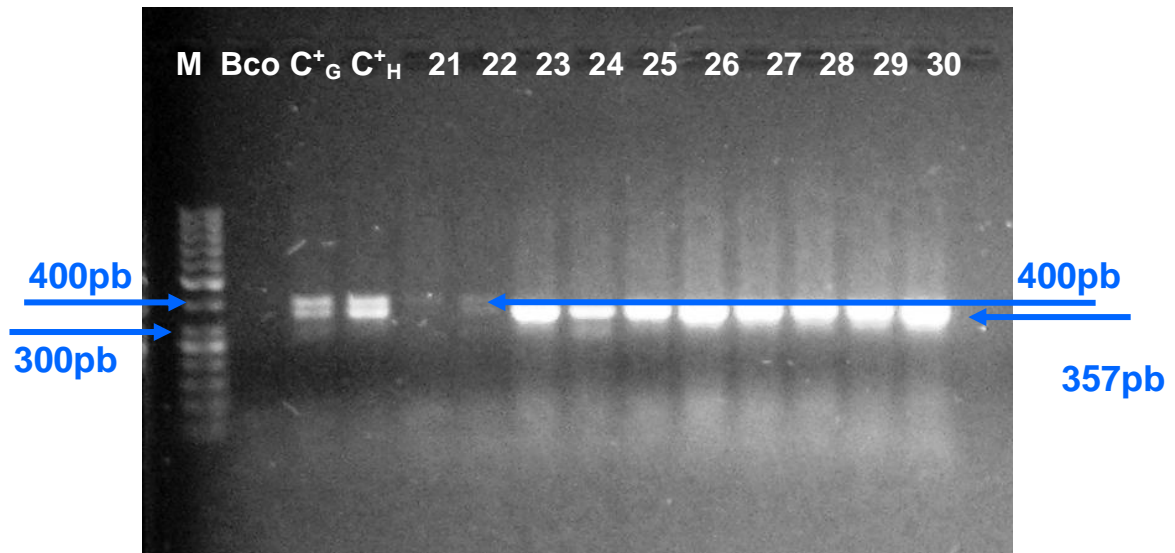


Figura C.4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 21 a 30 isolados positivos para *seh*; amostras 21 e 22, isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

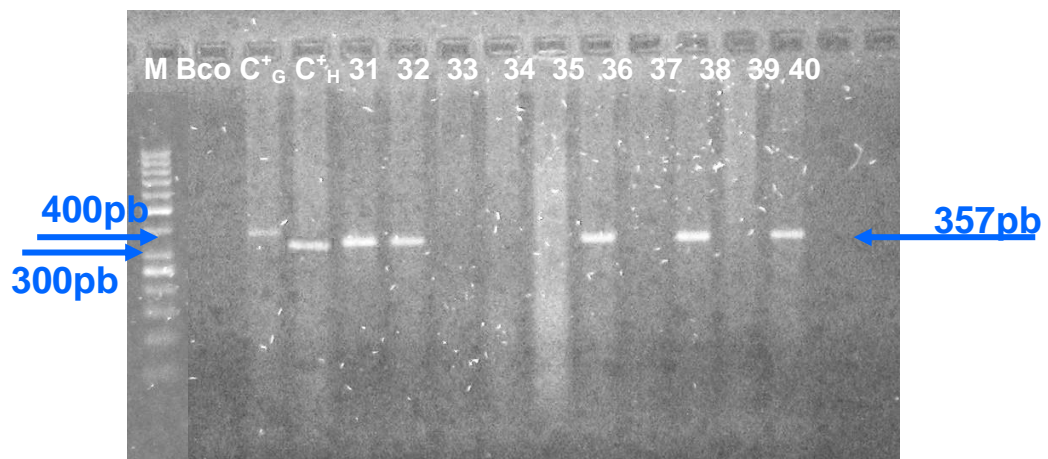


Figura C.5. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> e *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para os genes *seg* e *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 31, 32, 36, 38 e 40 isolados positivos para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sup>+</sup><sub>G</sub> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sup>+</sup><sub>H</sub> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

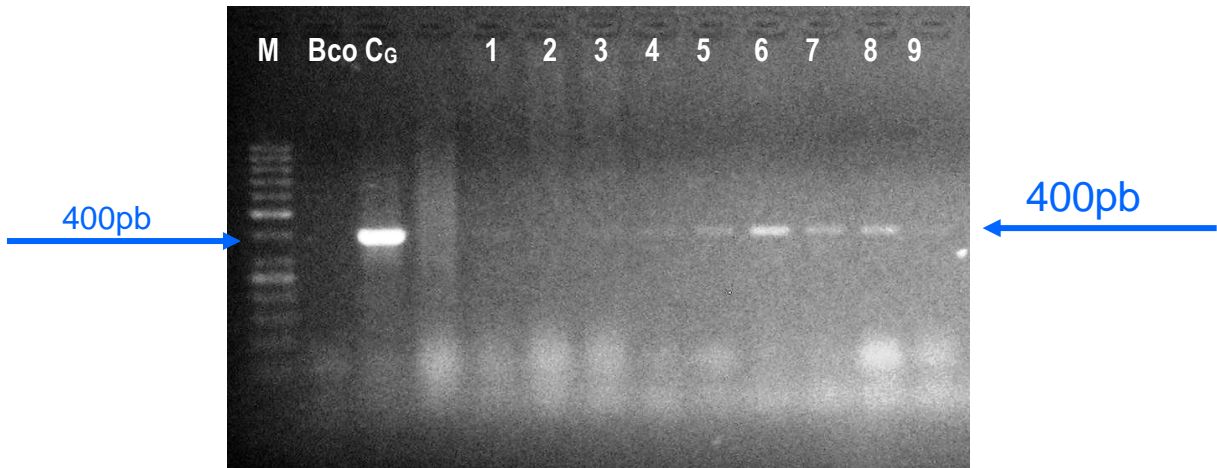


Figura C.6. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *seg*<sub>1</sub>/*seg*<sub>2</sub> para o gene *seg* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostras 1 a 9 isolados positivos para *seg*. Bco: controle negativo da reação; C<sub>G</sub><sup>+</sup> controle positivo para *seg* (*S. aureus* ATCC 19095; C<sub>H</sub><sup>+</sup> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

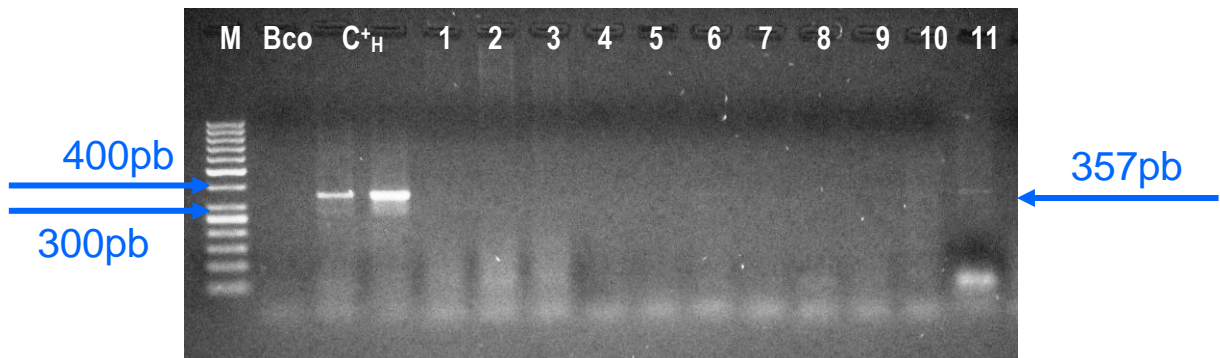


Figura C.7. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* *seh*<sub>1</sub>/*seh*<sub>2</sub> para o gene *seh* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos de queijo de Coalho industrial. Amostra 11 positiva para *seh*. Bco: controle negativo da reação; C<sub>H</sub><sup>+</sup> controle positivo para *seh* (*S. aureus* ATCC 19095). M é o marcador molecular de 50pb (Fermentas).

**Tabela C. 2.** Frequência dos genes *seg* e *seh* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de Coalho artesanal e industrial.

<b>Tipo de queijo</b>	<b>Marca</b>	<b>Espécies</b>	<b>Gene amplificado</b>
<b>Artesanal</b>	A	<i>S. aureus</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 3 <i>seh</i>
	B	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	1 <i>seg</i> 0 <i>seh</i>
	C	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp urealyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i>	0 <i>seg</i> 3 <i>seh</i>
	D	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	5 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	E	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lugdunensis</i>	3 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	F	<i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. lentus</i>	2 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	G	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 0 <i>seh</i>
<b>Industrial</b>	H	<i>S. haemolyticus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. xylosus</i>	4 <i>seg</i> 0 <i>seh</i>
	I	<i>S. xylosus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. cohnii ssp urealyticus</i>	5 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	J	<i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. sciuri</i>	1 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	L	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i>	1 <i>seg</i> 1 <i>seh</i>
	M	<i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 0 <i>seh</i>
	N	<i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 3 <i>seh</i>
	O	<i>S. aureus</i> , <i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 10 <i>seh</i>
P	<i>S. cohnii ssp cohnii</i> , <i>S. xylosus</i>	0 <i>seg</i> 0 <i>seh</i>	