

## 1. INTRODUÇÃO

Desde 1999, o Brasil figura entre os principais países exportadores de leite e derivados (PONCHIO, GOMES & PAZ, 2005). Embora ocupando a sexta posição no ranking dos países produtores, a geração de leite no Brasil é altamente heterogênea. Mas, apesar de ainda manter-se com números aquém dos principais produtores mundiais a eficiência brasileira vem aumentando (WILKINSON, 2009). Entre 1990 e 2006, a produção brasileira cresceu 75%, graças a um aumento do rendimento do rebanho em torno de 60%, que foi complementado com um crescimento de 40% no rebanho e de quase 10% no número de vacas ordenhadas. Neste mesmo período, as regiões que mais incrementaram sua produção leiteira foram o Norte (74,6%), Centro-Oeste (25%) e Sul (23%), havendo reduções nas regiões Sudeste (19,8%) e Nordeste (10,8%) (IBGE, 2007). Em 2015, as principais regiões produtoras de leite no Brasil foram a Sul, com uma participação de 35,2%, seguido da Sudeste (34,0%), Centro-Oeste (13,7%), Nordeste (11,9%) e Norte (5,2%) (IBGE, 2015). Com esse aumento, o volume de leite gerado já cobre 99% da necessidade do mercado interno e a perspectiva é que, em um curto prazo, seja suficiente para dispor de um excedente que possa ser exportado (CEPEA, 2011; MARTINS, 2007).

“Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas e bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1997). Em geral, o queijo é um dos alimentos mais nutritivos que se tem conhecimento, por ser um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos (lactose), vitaminas (principalmente A e B) e minerais, sendo também uma ótima fonte de cálcio (PERRY, 2004).

O consumo de queijos no Brasil aumentou significativamente nos últimos anos. De 2000 a 2008, registrou-se um aumento de 31% (per capita de 2,6 a 3,4 kg/ano) (EMBRAPA, 2011). Atualmente, o consumo médio per capita de queijos é de 5,1 quilos por ano e pelas estimativas da ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo), este consumo deverá alcançar 11 quilos, em média, em 2030, depois de ter avançado 76% entre 2005 e 2013. Considerando o

consumo total, o avanço foi de 8% a 9% ao ano, em média, nos últimos anos. Em 2013, alcançou 1,032 milhão de toneladas (ABIQ, 2014).

Em relação ao consumo domiciliar, com base na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003 realizada pelo IBGE (2004), os tipos de queijo mais consumidos são minas, principalmente na região Sudeste, e muçarela, seguidos por prato (com destaque para a região Sul) e requeijão. O queijo parmesão apresenta participação bem inferior, quando se considera o consumo domiciliar. Queijos nobres ou especiais, como o emental, estão conquistando cada vez mais os paladares dos brasileiros (ABIQ, 2012).

O queijo emental é comercializado em peças grandes ou fracionado e acondicionado em diversos tipos de embalagens. O invólucro dos alimentos desempenha importantes funções desde a sua produção até o momento em que é consumido, principalmente na preservação contra a contaminação por micro-organismos (OKURA et al., 2006).

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) continuam sendo um problema de saúde pública. Cerca de 75% das novas doenças que têm afetado os seres humanos ao longo dos últimos 10 anos foram causadas por patógenos provenientes de um animal ou produtos de origem animal e, todos os anos, milhões de pessoas adoecem em razão das zoonoses de origem alimentar. A análise microbiológica de um alimento visa investigar a presença de um determinado micro-organismo em um produto, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado e os prováveis riscos à saúde do consumidor (GERMANO, 1993; OMS, 2009).

*Staphylococcus* spp. são micro-organismos largamente distribuídos na natureza, sendo transmitidos aos alimentos por manipuladores (que na maioria dos casos são portadores assintomáticos), pois fazem parte da microbiota transitória e residente do homem, e também por animais, principalmente o gado leiteiro com mastite, apresentando alto número de micro-organismos no leite (STAMFORD et al., 2006). O *S. aureus*, espécie coagulase-positiva, é o mais comumente associado a casos de surtos de intoxicação alimentar devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (OMOE et al., 2005), porém existem trabalhos disponíveis na literatura (CARDOSO, 1999; SENA, 2000; CARMO, 2001; PIMENTEL et al., 2002) comprovando a toxigenicidade das espécies coagulase-negativas e, por este motivo, tais estafilococos não devem ser ignorados, especialmente se forem encontrados em grande número no alimento indicando, principalmente, precárias práticas de higiene por parte dos manipuladores (JAY, 2000).

Atualmente, órgãos internacionais como WHO (*World Health Organization*), ICMSF (*International Committee on Microbiological Specification for Foods*) e APHA (*American Public Health Association*) recomendam padrões e métodos de análise microbiológica, tanto clínica quanto de alimentos, para a rotina laboratorial, testes bioquímicos mínimos (coagulase, DNase e sensibilidade a novobiocina) para diferenciação na área clínica de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* e, em análise de alimentos, o *S. aureus* e *S. epidermidis*, entre outros (BRASIL, 2001a; SILVA et al., 1997).

Os alimentos preparados com produtos de origem animal são os mais envolvidos em casos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003), portanto a pesquisa do *Staphylococcus* spp. em queijos tipo emental é de extrema importância, garantindo higiene e segurança dos alimentos.

Dessa forma, o presente projeto visa identificar espécies de *Staphylococcus* spp. no queijo emental por meio de técnicas bioquímicas e moleculares em diferentes tipos de embalagem, a fim de verificar a presença de enterotoxinas e assim atestar a qualidade do produto final ao consumidor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL:

Determinar a presença e identificar as espécies de *Staphylococcus* spp. em amostras de queijo emental em 3 tipos de embalagem (resina, vácuo e atmosfera modificada) e evidenciar a ocorrência do fator de virulência enterotoxina (SE).

### 2.2. ESPECÍFICOS:

1. Identificar os *Staphylococcus* spp. através de provas morfotintoriais e bioquímicas (Gram, catalase, coagulase, DNase, termonuclease e API® STAPH e/ou VITECK® 2 Compact);
2. Determinar através da técnica de PCR os genes relacionados com a produção de enterotoxinas (SE);
3. Correlacionar o tipo de embalagem (vácuo, resina, atmosfera modificada) com a presença dos *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados e identificados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. MERCADO DE LEITE E QUEIJOS NO BRASIL

Os dados da Pesquisa Pecuária Municipal, com informações sobre a produção brasileira de leite mostram que em 2014, a produção de leite foi de 35,12 bilhões de litros, representando um aumento de 2,7% em relação à registrada no ano de 2013, fazendo o Brasil ocupar a quinta posição no *ranking* mundial de produção de leite de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China, porém em 2015, a produção foi de 35,00 bilhões de litros, representando uma retração de 0,4% em relação ao ano anterior, responsável pelo retorno do país para a sexta posição no *ranking* (IBGE, 2014; IBGE, 2015).

No ano de 2014, o Brasil produziu cerca de um 1,75 milhão de toneladas de queijo (ABIQ, 2014) com 20,6 mil toneladas importadas (ABIQ, 2015a). Os USA é o país que possui o maior mercado de queijos mundial com rentabilidade de vinte e dois bilhões de dólares/ano. Em segundo vem a França, com US\$ 9,4 bilhões. O Brasil é o sexto neste *ranking* (ABIQ, 2015c). O consumo de queijos no Brasil vem crescendo a cada ano embora, ainda esteja longe dos níveis europeus (GUIMARÃES et al., 2008). Entre 2006 e 2013 o Brasil aumentou em 8,3% o consumo *per capita* de queijos, passando de 3,0 Kg/ano para 5,3 Kg/ano neste período. Espera-se que em 2017 o consumo de queijo no Brasil possa chegar a 8,0 Kg por habitante/ano (CARVALHO et al., 2015).

A Mintel (agência de inteligência de mercado) realizou uma pesquisa no Brasil em 2013 sobre o consumo de queijo envolvendo 1500 pessoas de ambos os sexos, com idade mínima de 16 anos e variadas classes sociais, nas dez principais capitais brasileiras. De acordo com a pesquisa os queijos mais consumidos aqui são: muçarela (88%), requeijão (76%), queijo prato (75%), queijo branco (72%) e queijo parmesão (62%), porém, infelizmente, os queijos especiais como o emental ainda representam valores pouco expressivos no consumo (28%) (ABIQ, 2013), devido as questões culturais e, em geral, a baixa renda da população (ABIQ 2013; GUIMARÃES et al., 2008).

### 3.2. QUEIJO EMENTAL, EMBALAGEM E PRESERVAÇÃO.

O Ministério da Agricultura entende por queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou do leite reconstituído ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas, bactérias específicas e ácido orgânico, isolados ou combinados (BRASIL, 1997).

O queijo tipo emental, também conhecido como “emmentaler” ou "suiço", é de origem Suíça, do vale do Emme, na região de Berna. Sua fabricação teve origem no século XV. Apresenta cor amarelada, casca escovada e dura, consistência média e características olhaduras com olhos de 10 a 25 mm de diâmetro originados pelo CO<sub>2</sub> produzido pela bactéria *Propionibacterium shermanii* (HUNT, 2012), e é classificado segundo a ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) como queijo de média umidade, cerca de 36% (BRASIL, 2001a). Sua produção é feita com leite de vaca e sua pasta é cozida, prensada e devidamente maturada pelo espaço mínimo de quatro meses. Seu sabor é suave e levemente adocicado. Como características sensoriais possui consistência semidura, elástica de consistência semimanteigosa, cor amarela, homogênea e translúcida, crosta firme, grossa, lisa de cor amarelo-parda, odor e sabor característicos, agradável, tendendo a adocicado e picante, suave (BRASIL, 2006).

No caso de alimentos embalados, a embalagem desempenha importante papel desde a sua produção até o momento de seu consumo. Possui papel fundamental na conservação de alimentos, prorrogando sua deterioração química ou microbiológica e garantindo sua qualidade e inocuidade ao consumidor. Também não deve conferir aos alimentos quaisquer alterações em suas características sensoriais (OKURA et al., 2006). Na produção de queijos podem ser utilizados diversos tipos de embalagens, por exemplo, o queijo fresco, que é muito perecível e frágil, deve ser acondicionado em embalagem que evite sua desidratação e o contato com a luz e oxigênio do ar. Alguns queijos como o emental, podem ser produzidos e até comercializados em peças maiores utilizando apenas uma resina, que reveste toda a peça, como embalagem o que evita a degradação microbiana em sua superfície. Nos casos onde a peça é porcionada para facilitar a comercialização, este fato pode ocorrer no próprio Laticínio e podem ser utilizadas como embalagem além da resina, o vácuo e as embalagens com mistura de gases chamadas de embalagens com atmosfera modificada (OKURA et al., 2006; PAULA et al., 2012).

A embalagem com resina (dispersão de copolímeros livre de plastificantes e autorizada pelo MAPA e ANVISA) normalmente utilizada em queijos tem a finalidade de reduzir a quantidade de bolores, evitar a perda excessiva da umidade durante a maturação e também reduzir a necessidade de movimentação constante das peças o que origina um produto de melhor qualidade (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001b). O processo de embalagem a vácuo consiste na retirada do ar ao redor do alimento e na selagem da embalagem, melhorando consideravelmente o tempo de conservação do produto em relação ao produto *in natura* pois controla a deterioração química e microbiana (EILERT, 2005). O processo de embalar à vácuo pode estender a vida útil de um alimento perecível de 3 a 5 vezes o tempo de vida normal quando refrigerado. Este tipo de embalagem também tem papel na diminuição do ressecamento dos laticínios sem alterar seu sabor (JAY, 2005; SMITH et al., 1990). A embalagem em atmosfera modificada é uma evolução da embalagem à vácuo, na qual, se introduz uma mistura de gases composta por CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. A mistura de gases utilizada depende da natureza do alimento e dos mecanismos possíveis de deterioração. Quando a deterioração é principalmente microbiana a composição gasosa típica é de 30% a 60% de CO<sub>2</sub> e 40% a 70% de N<sub>2</sub>, com concentração muito baixa de O<sub>2</sub>, pensando-se em prorrogar o tempo de vida útil e sem usar conservantes químicos (HINTLIAN & HOTCHKISS, 1986; PARRY, 1993; ROBERTSON, 2006). A modificação da atmosfera no interior da embalagem é determinada pela interação de três fatores: respiração do produto, difusão do gás através do produto e permeabilidade do filme aos gases (MANTILLA et al., 2010). A tecnologia de atmosfera modificada já vem sendo empregada para alguns queijos, por exemplo, o queijo parmesão ralado e muçarela sob diversas apresentações e muçarela de búfala. Usando essa tecnologia houve melhoria na apresentação do produto com a manutenção da sua forma original (no vácuo o produto é deformado) e também na preservação da cor original (SARANTOPOULOS, 1995; PAULA et al., 2012).

### 3.3. *STAPHYLOCOCCUS* spp. EM QUEIJO

Diversos fatores podem contribuir para a presença de micro-organismos patogênicos em queijos em níveis elevados, tais como: a composição química do leite, sua microbiota natural, a contaminação após a pasteurização, o processamento e a manipulação, os equipamentos, a

temperatura inadequada durante estocagem e transporte, entre outros (ARAÚJO et al., 2002). A contaminação microbiana dos queijos assume destacada importância, tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar DTAs (doenças transmitidas por alimentos) (FEITOSA et al., 2003).

*Staphylococcus* spp. é um dos principais agentes causadores de surtos de intoxicação alimentar, por serem frequentemente introduzidos nos alimentos através de manipuladores, portadores assintomáticos, uma vez que fazem parte da microbiota transitória dos homens e animais (STAMFORD et al., 2006). A resolução RDC nº 12 (de 2 de janeiro de 2001), do Ministério da Saúde estabelece o limite de  $10^3$  UFC (unidades formadoras de colônias)/g para cepas de estafilococos produtoras de coagulase em queijos frescos ou maturados coletados no comércio (BRASIL, 2001a), mas não menciona os estafilococos não produtores de coagulase.

O gênero *Staphylococcus* é formado por 52 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2017). As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos imóveis, pertencentes à família Micrococcaceae, não formadores de esporos e catalase positiva. Esses micro-organismos ocorrem na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas, porém aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva e são em sua maioria anaeróbios facultativos polares (KONEMAN et al., 2008). Possuem uma única parede celular de peptidoglicano, caracterizada por múltiplos resíduos de glicina com pontes de peptídeos (CROSSLEY, 1997). São bactérias, halotolerantes (10 a 20% de NaCl) e neutrófilas, porém toleram variações de pH entre 4,0 e 9,8. São anaeróbios facultativos e, portanto, produzem energia (ATP) tanto pela via respiratória quanto pela via fermentativa (CROSSLEY, 1997). Mesmo sendo mesófilas, algumas cepas de *Staphylococcus* spp., especialmente *S. aureus*, podem crescer em temperaturas abaixo de  $6,7^{\circ}\text{C}$ . Seu crescimento pode ocorrer entre  $7^{\circ}\text{C}$  e  $48^{\circ}\text{C}$ , sendo  $37^{\circ}\text{C}$  considerado ótimo para seu desenvolvimento. A enterotoxina (SE) é produzida entre  $10^{\circ}\text{C}$  e  $48^{\circ}\text{C}$ , contudo a faixa de  $40^{\circ}\text{C}$  a  $45^{\circ}\text{C}$  é ideal para a sua produção (JAY, 2000; GERMANO & GERMANO, 2003). Segundo Franco e Landgraf (2008), o micro-organismo possui metabolismo ativo com atividade de água a partir de 0,86, sendo que este valor pode variar de acordo com os substratos e a quantidade de oxigênio presente no meio (JAY, 2000; GERMANO & GERMANO, 2003).

As espécies de *Staphylococcus* spp. produzem grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência. Cerca de 34 tipos diferentes de proteínas extracelulares podem ser sintetizadas por estafilococos sendo que muitas delas estão envolvidas no processo de patogenicidade e virulência do micro-organismo (PEREIRA et al., 1999). Dentre estas



exoproteínas destacam-se como importantes fatores de virulência e patogenicidade um grupo de enzimas (nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase) e citotoxinas (hemolisinas), sendo que a principal função deste conjunto é a utilização do tecido hospedeiro para conversão em fatores nutricionais necessários ao metabolismo e crescimento bacteriano. Algumas cepas produzem uma ou mais proteínas extracelulares, incluindo a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas (SE), as toxinas esfoliatinas (ETA e ETB) e a leucocidina (DINGES et al., 2000).

Outro importante fator de virulência é a produção de enzima coagulase e, por este motivo, os estafilococos são classificados em coagulase-positivos e coagulase-negativos (FORSYTHE, 2002). A produção de coagulase está muitas vezes associada à capacidade de produção de toxinas por espécies de estafilococos, sendo desta forma um indicador indireto do potencial patogênico do micro-organismo, justificando assim seu isolamento e identificação (LANCETTE & TANINI, 1992). Tanto espécies coagulase-positivas, quanto coagulase-negativas são causadoras da toxínose estafilocócica (DOYLE, 1989).

A toxínose estafilocócica é causada pela ingestão de alimento contendo uma ou mais enterotoxinas pré-formadas, produzidas somente por bactérias do gênero *Staphylococcus* (JAY, 2000). Em alimentos o *S. aureus*, classificado como coagulase-positivo, é a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, representando, em média, 98% dos surtos por este gênero (FRANCO & LANDGRAF, 2006; SU & WONG, 1997). Embora a espécie *Staphylococcus aureus* apresente consideráveis diferenças em relação às espécies coagulase-negativas a respeito de sua patogenicidade, uma vez que produz elevado número de fatores de virulência e outras proteínas, enquanto as demais espécies produzem apenas alguns destes fatores, a produção de enterotoxinas não está restrita exclusivamente a esta espécie (JAY, 2000, CROSSLEY, 1997). Outras espécies como, por exemplo, *Staphylococcus intermedius* (BECKER et al., 2001) e *Staphylococcus hyicus* (ADESIYUN et al., 1984), também coagulase-positivas, produzem enterotoxinas e têm sido envolvidas em alguns surtos podendo ser potenciais causadores de intoxicação alimentar (KHAMBATY et al., 1994).

Com o refinamento das metodologias analíticas foi possível evidenciar que há espécies coagulase negativas capazes de produzir toxinas, como *S. xylois*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus* (VALLE et al., 1990), evidência também confirmada pelos trabalhos de Pereira et al. em 2001 e Lamaita

et al. col. em 2005. Borges et al. (2008) relatam que os *Staphylococcus* coagulase negativa são potenciais produtores de enterotoxinas como verificado também em outros trabalhos, sendo a maioria sob condições de laboratório, que devem sim ser considerados (VALLE et al., 1990; CHENG-CHUN & LI-FEN, 1997).

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) eram considerados bactérias não patogênicas até a sua descoberta como agentes responsáveis por infecções nosocomiais (contraídas em ambiente hospitalar) (KLOOS & BANNERMAN, 1994; VERMONT et al., 1998). As principais espécies de ECN envolvidas em infecções são: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis* e *S. xylosus*, embora outras espécies possam também causar infecções em humanos (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003).

Acreditava-se que a produção de enterotoxinas pudesse estar relacionada às cepas que fossem produtoras de coagulase e termonuclease (TNase), porém muitas espécies de *Staphylococcus* demonstraram produzir enterotoxinas mesmo sem produzir as enzimas coagulase e termonuclease. Em um estudo sobre estafilococos isolados de caprinos saudáveis, 74,3% de 70 cepas coagulase-positivas e 22,0% de 272 cepas coagulase-negativas eram produtoras de enterotoxinas (JAY, 2000). A produção simultânea de diferentes tipos de toxinas pode aumentar os seus efeitos toxigênicos isolados, sugerindo que essa coprodução possa desempenhar papel importante na patogenia das infecções produzidas por este micro-organismo (FAGUNDES & OLIVEIRA 2004).

A propriedade característica mais marcante das enterotoxinas estafilocócicas (SE) é a superantigenicidade, que é a habilidade destas toxinas em estimular a proliferação de linfócitos T sem considerar a especificidade antigênica destas células. Os genes codificadores destas toxinas estão localizados em plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos heterólogos denominados “ilhas de patogenicidade” (DINGES et al., 2000). As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, situado entre 26.900 e 29.600 dáltons, estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico. Possuem dois resíduos de cisteína, que formam alças por intermédio de pontes de dissulfeto. São hidrossolúveis e no seu estado ativo, resistem à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina, permanecendo ativas após a ingestão. Apresentam, também, a propriedade de termorresistência, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a

ultrapasteurização, o que constitui ponto crucial em controle de qualidade de alimentos, uma vez que a enterotoxina pode persistir no produto final, após o processamento térmico (PEREIRA et al., 1999). São produzidas quando a quantidade de células bacterianas está entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g ou mL do alimento (BALABAN, 2000). Segundo Bergdoll, (1989) é necessário menos de 1  $\mu$ g de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica, sendo que a população de  $10^5$  UFC de *Staphylococcus*/g ou mL de alimento já provoca quadro de intoxicação. Forsythe (2002), afirma que uma dose de toxina menor que 1,0  $\mu$ g/kg (300 a 500 ng) em alimentos contaminados poderá produzir sintomas de intoxicação por estafilococos. Neto et al. (2002) dizem que níveis de toxinas variando de 0,01 a 0,4  $\mu$ g por grama de alimento são suficientes para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis.

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. De acordo com Nicolau et al. (2001) os tipos clássicos SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH e SEI são considerados os de maior ocorrência, porém, atualmente foram caracterizados novos tipos SEs (SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU) (YARWOOD et al., 2002; LETERTRE et al. 2003a), totalizando vinte SEs, porém somente os tipos clássicos foram envolvidos com intoxicação alimentar (CENCI-GOGA et al., 2003). De acordo com Letertre, (2003b, 2003c), SEA é a enterotoxina mais comumente encontrada nos alimentos como causa de intoxicação e que 95,0% dos surtos de intoxicação estafilocócica são causados por SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE.

A toxiose estafilocócica se dá ao ingerir alimentos, inicialmente contaminados com a bactéria, submetidos a temperaturas de cocção insuficientes para provocar sua destruição e posteriormente mantidos a temperaturas inadequadas para sua conservação, o que acarreta a multiplicação bacteriana e consequente produção de enterotoxina. O mesmo se aplica aos alimentos contaminados após a correta preparação, porém mantidos sob temperatura inadequada de conservação (GERMANO & GERMANO, 2003). Vômito e diarreia são os principais sintomas do quadro clínico observado na intoxicação estafilocócica. Calafrios, dores abdominais, náuseas e prostração ocorrem usualmente, porém sem estado febril. A intensidade dos sintomas depende da quantidade de alimento contaminado ingerido, da dose de toxina que este alimento continha, da suscetibilidade individual à toxina e do grau de imunidade da pessoa exposta. Os sintomas clínicos podem se manifestar entre 30 minutos a 8 horas após a ingestão do alimento contendo a toxina,

porém o período médio de incubação é de 4 horas. A doença apresenta início abrupto, mas com caráter geralmente não fatal, autolimitada e com o restabelecimento do doente observado em torno de 24 a 72 horas (PEREIRA et al., 1999; GERMANO & GERMANO, 2003; JAY, 2000).

Ainda não está bem demonstrado como se dá o desenvolvimento da imunidade nos seres humanos às toxinas estafilocócicas. Entretanto, anticorpos para um tipo de SE não conferem necessariamente imunidade à intoxicação estafilocócica, uma vez que diversas SEs são capazes de induzir a doença. Em alguns casos, anticorpos produzidos contra um tipo de SE podem desencadear reação cruzada contra outro tipo de SE. Por exemplo, anticorpos heterólogos para SEB podem conferir proteção cruzada contra SEC, devido a estas duas enterotoxinas possuírem pontos de ligação com os anticorpos extremamente semelhantes quimicamente (DINGES et al., 2000).

### 3.4. DTAs E TOXINOSE ESTAFILOCÓCICA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), define-se doença de origem alimentar como aquela usualmente infecciosa ou tóxica causada por agentes que penetram no hospedeiro através da ingestão de alimentos podendo ocorrer de forma individual ou em surtos (WHO, 2016). O Ministério da Saúde define surto de DTA como um evento, que acomete duas ou mais pessoas onde as mesmas apresentem, num equivalente período e tempo, sinais e sintomas semelhantes, caracterizados, geralmente como distúrbios intestinais, após ingerir um mesmo alimento considerado contaminado através de evidências clínicas, epidemiológicas e/ou laboratoriais (VARGAS, 2002). Através de inquérito epidemiológico se determina a ocorrência de um surto e para tal, verifica-se os comensais que ingeriram os alimentos suspeitos, os sintomas apresentados e os exames laboratoriais feitos nas amostras biológicas (geralmente fezes) e nos alimentos consumidos (FRANCO & LANDGRAF, 2008). A maioria dos surtos

ocorre em alimentos sem alterações organolépticas visíveis, isso porque a dose infectante do patógeno normalmente é menor do que a dose necessária para causar essas alterações, dificultando sua rastreabilidade, pois em casos de investigação epidemiológica os pacientes não conseguem associar o alimento visivelmente “saudável” como possível fonte de contaminação (OLIVEIRA et al., 2010).

Há mais de 200 doenças veiculadas por alimentos contaminados por bactérias, parasitas, vírus ou substâncias químicas (OMS, 2014). As DTAs são conhecidas desde tempos remotos. Há relatos que em 2000 a.C., Moisés determinou algumas leis sobre métodos de preparo dos alimentos (incluindo aqueles que se podia comer e os que se deveria rejeitar), assim como a importância de se higienizar as mãos antes de ingerir os alimentos. Entretanto, foi somente no século XIX, com as descobertas de Louis Pasteur, que ficou estabelecido à relação entre micro-organismos e a deterioração dos alimentos, incluindo a capacidade destes de causarem doença (MAYER & SILVA, 2009).

Com base nos dados da Organização Mundial da Saúde, são detectados anualmente, nos países em desenvolvimento, mais de um bilhão de casos de diarreia aguda em crianças com menos de cinco anos, destas, 5 milhões chegam ao óbito. Existem cálculos de que até 100 milhões de indivíduos contraem doenças decorrentes do consumo de alimentos, bebidas e águas a nível mundial (ADAMS e MONTARJEMI, 2002). No ano de 2010, de todas as vítimas mundiais de DTAs, 420 mil morreram e, entre elas, 125 mil eram crianças abaixo de cinco anos, de acordo com relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2015). O CDC (*Center of Disease Control - USA*) estima que a cada ano cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) fica doente, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem de DTAs. Pesquisas apontam que 37,2 milhões de pessoas adoeceram, com 228.744 hospitalizações e 2.612 óbitos, causados por patógenos conhecidos, principalmente Norovirus (58%), *Salmonella* spp. (11), *Clostridium perfringens* (10%), *Campylobacter* spp. (9%) e *Staphylococcus aureus* (3%), porém, patógenos não identificados contabilizaram cerca de 141,8 milhões de casos com 258.033 hospitalizações e 3.574 óbitos (CDC, 2011).

No Brasil ainda se conhece muito pouco sobre o perfil epidemiológico das DTAs, somente alguns municípios, em poucos estados, dispõem de estatísticas com dados sobre os agentes etiológicos e alimentos mais frequentemente implicados, entre outros. Sabe-se que a incidência varia de acordo com nível de educação, condições socioeconômicas, de saneamento, fatores ambientais e culturais, dentre outros (BRASIL, 1999; CARMO et al., 2005).

De janeiro de 2007 a junho de 2016 o Brasil apresentou 6.632 surtos de DTAs com 469.482 indivíduos expostos, dos quais 118.104 adoeceram, 17.186 necessitaram de hospitalização e 109 foram a óbito. A maior incidência de surtos ocorreu na Região Sudeste com 43,8% dos casos, seguida pela Região Sul com 24,8%, Região Nordeste com 19,5%, Região Norte com 6,9% e Região Centro-Oeste com 6,3% dos casos. Verificou-se ainda que a grande maioria das contaminações ocorreu em ambiente doméstico (38,9%) e em restaurantes/padarias e similares (16,2%). Em 66,8% dos casos notificados não se conseguiu identificar o alimento envolvidos no surto, porém em 9,0% deles, os alimentos mistos foram os responsáveis, em 6,0% a água, em 3,6% os ovos e produtos derivados de ovos e em 2,6% o leite e derivados, entre outros de menor expressão. As pesquisas demonstram que 90,5% dos patógenos envolvidos nos surtos são bactérias, 7,1% vírus, 1,7% agentes químicos, 0,7% protozoários e 0,1% fungos. Não se conseguiu identificar o micro-organismo responsável pela contaminação do alimento em 70,3% dos casos analisados. Dos 29,7% de alimentos onde os micro-organismos foram identificados, 7,5% foram *Salmonella* spp., 7,2% *Escherichia coli* e 5,8% *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016a).

Dentre as diversas espécies associadas a casos de DTAs, os *Staphylococcus* spp. são os mais frequentemente pesquisados, sendo que o queijo é um dos principais alimentos capazes de causar toxiose estafilocócica (REIBNITZ et al., 1998). No Brasil, os surtos investigados têm sido associados principalmente ao consumo de queijos do tipo minas frescal e queijo minas (CARMO et al., 2001), pois são produtos de alta umidade favorecendo sua contaminação. Todas as etapas da produção de um queijo, desde a ordenha do leite na propriedade rural até sua produção, maturação e embalagem, devem ser realizadas em condições que proporcionem a prevenção da contaminação do produto garantindo sua qualidade e inocuidade (EILERT, 2005). Dessa forma, as boas práticas de fabricação e as medidas de higiene e segurança durante o processamento são definitivas para a garantia da qualidade do produto (PICOLI et al., 2006).

Os manipuladores são a fonte mais importante de contaminação (HOLT et al., 1994). Neste contexto, o aquecimento do alimento após sua manipulação torna-se relevante na prevenção de toxinfecções (MOTTA et al., 2000) sendo necessário 60 °C entre 43 segundos a 8 minutos para destruição do *S. aureus* (SANTANA et al., 2010), contudo sua toxina é termorresistente. Dessa forma, os cuidados com a refrigeração devem ser tomados após o aquecimento, caso contrário, o micro-organismo poderá multiplicar-se e produzir toxina (MOTTA et al., 2000). Segundo Santana et al. (2010), no estado do Paraná em 1998, ocorreram 200 surtos, sendo que em 107 apenas se diagnosticou o agente causador e o *S. aureus* foi

responsável por 30 destes casos. Em Minas Gerais entre 1995 e 2001, ocorreram 12.820 casos de pessoas acometidas por toxiose estafilocócica, com 17 óbitos e, em São Paulo, entre 2001 e 2002, foram relatados 25 surtos de intoxicação causada por *S. aureus* acometendo 200 pessoas.

Após a ingestão da toxina estafilocócica no alimento contaminado, sintomas como vômito, diarreia, náuseas, começam a se manifestar entre 1 a 6 horas podendo durar de 1 a 2 dias e regredir ou evoluir para quadros mais graves em casos de pacientes debilitados culminando por vezes em óbito. A mortalidade por intoxicação alimentar estafilocócica é incomum, entretanto pode ocorrer em crianças, idosos e indivíduos com sistema imunológico debilitado (CUNHA & CUNHA, 2007).

### 3.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O monitoramento da qualidade alimentar é a maior segurança para um comensal, pois, por meio dele, é possível verificar as condições sanitárias entre outros aspectos que sejam satisfatórios para o conceito de qualidade e obedeçam às normas exigidas (KOCHANOSKI et al., 2009). A análise microbiológica dos alimentos tem como objetivo a investigação da presença de um determinado micro-organismo na amostra de um produto, bem como caracterizar as diferentes espécies para concluir em quais condições higiênicas o alimento foi processado e se confere riscos ao consumidor. Por volta de 75% das novas doenças que têm afetado os seres humanos nos últimos 10 anos, foram causadas por patógenos oriundos de animais ou produtos de origem animal, ocasionando em milhares de pessoas as zoonoses de origem alimentar (GERMANO, 1993; OMS, 2009).

O queijo possui rica composição nutricional o que favorece sua contaminação por diversos micro-organismos, inclusive *Staphylococcus* spp., cuja contagem elevada pode indicar a qualidade do produto (SALVADOR et al., 2001). Surtos de intoxicação alimentar de origem estafilocócica são, principalmente, associados às cepas que produzem colônias típicas em meio com emulsão de gema de ovo e telurito, como o ágar Baird-Parker, sendo elas, colônias negras

com halo opaco ao redor, seguido de outro halo transparente. Na rotina as colônias atípicas, desprovidas de halo, não são submetidas a testes para confirmação (HARRIGAN, 1998). Entretanto, tais colônias podem corresponder a cepas de estafilococos potencialmente produtoras de toxinas, principalmente pertencentes ao grupo coagulase-negativas (SILVA et al., 1999). Cepa de *S. aureus* com morfologia atípica foi relatada como causadora de surto de infecção alimentar no Japão (MIWA et al., 2001). Deriva desses fatos a necessidade de se testar as colônias atípicas, visando à avaliação segura de contaminação por estafilococos.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAS DE QUEIJO

As amostras de queijo foram provenientes de um Laticínio localizado no município de Buritis (MG) com Serviço de Inspeção Federal e que segue as normas estabelecidas pela IN-62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003c). A qualidade do leite utilizado para a produção dos queijos obedece às normas legais vigentes e o laticínio pratica os procedimentos de boas práticas de fabricação (BPF) e manipulação (BPM) e, portanto, deduz-se que os queijos produzidos atendam aos requisitos do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo emental (BRASIL, 1996).

Foram produzidos, dez lotes do queijo Emental, com três tipos de embalagem e em seis tempos de prateleira, totalizando 180 amostras de queijo. Após a produção dos lotes, cada peça foi fracionada em três partes. Em uma delas, foi aplicada a resina de proteção, em outra, a embalagem a vácuo utilizando o equipamento Selovac® e, a terceira porção, foi embalada no equipamento de atmosfera modificada que injeta na embalagem uma mistura gasosa (Figura 1). Após embalados, os lotes foram mantidos em condições de refrigeração entre 4 °C a 8 °C e enviados ao Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo para a realização das análises microbiológicas. As colônias caracterizadas como sendo *Staphylococcus* spp. foram armazenadas em ágar nutriente e caldo BHI com 10% de glicerol. As cepas foram posteriormente ressuspendidas em ágar Mueller-Hinton e identificadas através de provas bioquímicas para confirmação de gênero (catalase e coloração de Gram) e determinação da espécie (prova da coagulase em tubo, prova da DNase, termonuclease (TNase) e kits de identificação API® STAPH ou o sistema VITEK® 2 Compact, de acordo com a disponibilidade do kit no momento da análise).

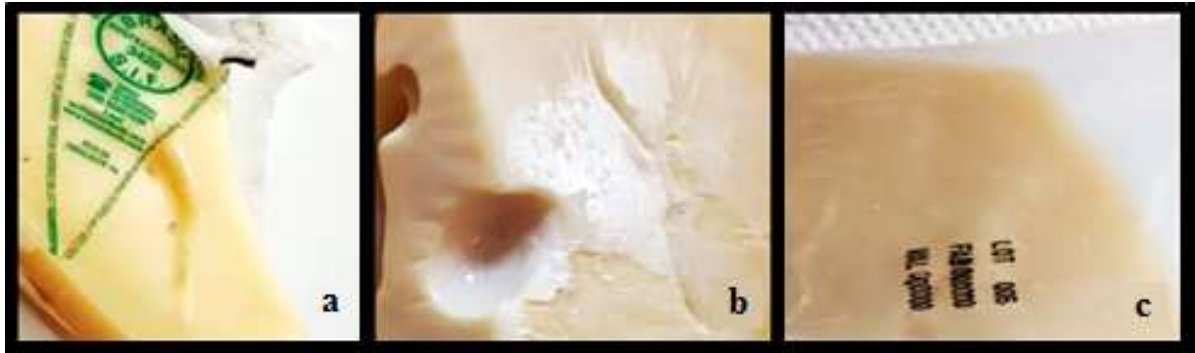


Figura 1 – Amostras de Queijo Embaladas a Vácuo (a), com Resina (b) e Atmosfera Modificada (c).  
Fonte: Lab. de Bacteriologia do Instituto Biológico de São Paulo

#### 4.2. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

As colônias presuntivas foram ressuspensas em NaCl a 0,85% e isoladas em ágar Mueller-Hinton (Figura 2) e em seguida submetidas a testes preliminares como prova da catalase (Figura 3) e coloração de Gram (Figura 4), para confirmação do gênero (BRASIL, 2003d).

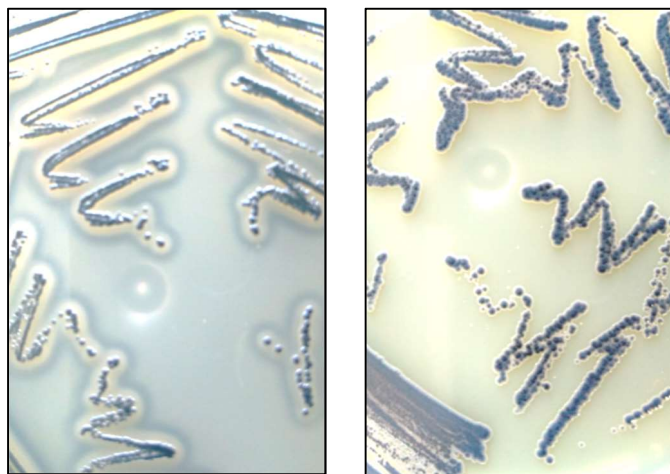


Figura 2 – Colônias do Gênero *Staphylococcus* spp. em Ágar Mueller-Hinton.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.2.1 – Prova da Catalase

Baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de bolhas e desta forma, distinguir os grupos estafilococos (que são positivos) e estreptococos (que são negativos) (BRASIL, 2003d). O procedimento consistiu em retirar uma colônia a ser testada da placa com meio de cultura, utilizando alça bacteriológica estéril e homogeneizá-la sobre uma gota de água oxigenada a 3%, previamente depositada sobre uma lâmina de vidro e, em seguida, observar a formação de bolhas. A presença de bolhas indica ser a família Micrococcaceae (que inclui o gênero *Staphylococcus* spp.) (Figura 3). A ausência de bolhas indica ser a família Streptococcaceae (BRASIL, 2016b).



Figura 3 – Prova da Catalase.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.2.2 – Coloração de Gram

A finalidade da coloração de Gram é evidenciar as características morfotintoriais das bactérias classificando-as em quatro grandes grupos: cocos Gram-positivos, cocos Gram-negativos, bacilos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos (BRASIL, 1997). Estruturas em forma esférica e coradas de roxo indicam a presença de cocos Gram-positivos. (Figura 4).



Figura 4 – Coloração de Gram – Cocos Gram-positivos.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE *STAPHYLOCOCCUS*

Para a confirmação das cepas e identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. utilizou-se a prova da coagulase em tubo, a prova da DNase, da termonuclease (TNase) e o kit de identificação API® STAPH ou o sistema VITEK® 2 Compact, dependendo da disponibilidade do kit no momento da análise.

#### 4.3.1. Coagulase em Tubo

Semeou-se com o auxílio de alça bacteriológica, 2 a 4 colônias crescidas a partir da placa de ágar BHI, em tubos contendo 0,5 mL de plasma de coelho, homogeneizando-se com cuidado. Incubou-se em estufa a uma temperatura de  $35\pm 2$  °C durante, um máximo de 24 horas, com observação do teste a cada meia hora, durante as primeiras 4 horas, pois, muitas estirpes produtoras de enzimas fracas só irão coagular o plasma ao final de 24 h de incubação, enquanto as produtoras de enzimas fortes coagulam nas primeiras 4 horas e, posteriormente, fibrinolizam dissolvendo o coágulo (BRASIL, 1997b). Qualquer grau de coagulação observado é considerado como resultado positivo. (Figura 5)



Figura 5 – Teste de Coagulase em Tubo.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.3.2. Teste de DNase

Com a cepa a ser testada foi realizado inóculo denso de forma circular em uma pequena parte do ágar DNase, previamente dividido em quadrantes como demonstrado na Figura 6. A incubação da placa foi realizada a  $35\pm 2$  °C por 18 - 24 h. Decorrido o período de incubação, acrescentou-se sobre o ágar diversas gotas de HCl 1 N para a revelação da prova. O DNA polimerizado presente no ágar precipita na presença do ácido clorídrico tornando o meio opaco. Quando o micro-organismo produz a enzima DNase, a mesma se difunde ao redor da colônia e hidrolisa o DNA presente no meio formando um halo claro nesta região (Figura 6). A evidenciação do halo claro é sugestiva de *S. aureus*, porém se faz necessária a confirmação com provas bioquímicas adicionais. Isolados que não apresentam a formação de halo claro foram considerados como *Staphylococcus* spp. não aureus.

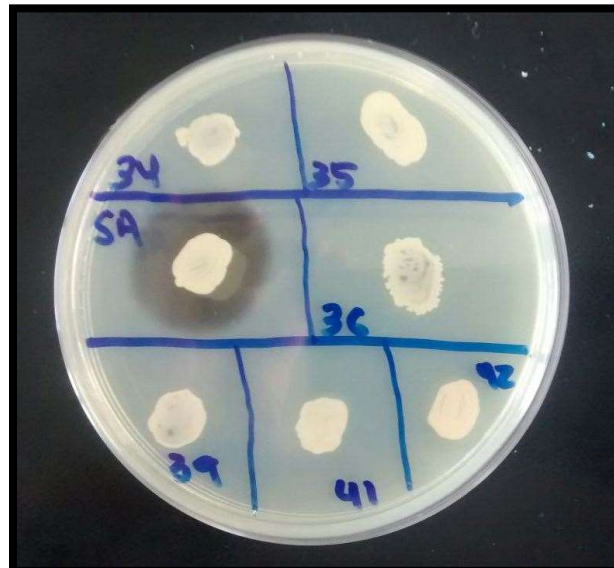


Figura 6 – Teste de DNase.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.3.3. Teste de TNase (Termonuclease)

Foram feitos orifícios equidistantes, com cerca de 2 mm de diâmetro cada, no ágar para ensaio de termonuclease (ágar DNase com azul de toluidina), em placas previamente preparadas. Os tubos contendo os isolados para teste foram mantidos em caldo BHI, em banho-maria fervente por 15 minutos e posteriormente resfriados. Os orifícios foram preenchidos com 5 µL de cada caldo de cultura e a incubação da placa foi realizada a  $35 \pm 2$  °C por 4 horas. O aparecimento, ao redor dos orifícios, de um halo rosa no ágar para ensaio de termonuclease foi indicativo de reação positiva para termonuclease (Figura 7). Considerou-se como positivas as culturas que apresentaram halo rosa com diâmetro superior a 1 mm. O *S. aureus* é termonuclease positiva.

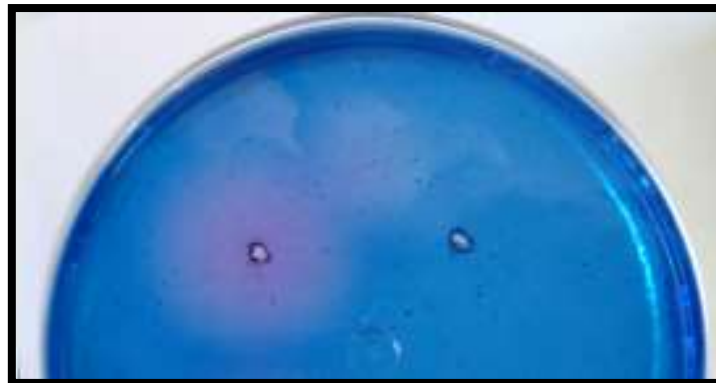


Figura 7 – Teste de TNase.  
Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.3.4. API® STAPH e VITEK® 2 Compact

Utilizou-se o Kit API® STAPH (Figura 8) e o sistema VITEK® 2 Compact (Figura 12), conforme instruções do fabricante e de acordo com a disponibilidade do kit no momento

da análise.

#### 4.3.4.1. API® STAPH

Sistema padronizado para a identificação dos gêneros, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* desenvolvido pela API System S.A., Montalieu-Vercieu, France. O API® STAPH *strip system*, combina vinte testes bioquímicos miniaturizados e possui, para tal, vinte microtubos que contêm substratos desidratados, cada um para a realização de uma prova bioquímica diferente, muitas das quais foram derivadas a partir de esquemas simplificados de identificação de cocos Gram positivos estabelecidos na literatura. O sistema API é particularmente vantajoso na medida em que o kit fornece tiras pré-formadas contendo os substratos dos testes e também os reagentes necessários para revelar alguns dos testes. Além disso, na maioria dos casos, as reações já podem ser interpretadas após incubação a 37 °C durante 24 horas (BRUN, FLEURETTE, FOREY, 1978; GEMMELL E DAWSON, 1982). Os microtubos são inoculados com uma suspensão bacteriana homogênea feita utilizando a cepa de interesse e o API STAPH Medium, com opacidade equivalente a escala 0,5 de McFarland. Após o preparo do inóculo, as tiras com os microtubos devem ser preenchidas e incubadas, em caixa de incubação (presente no kit), com ambiente úmido e a uma temperatura de  $36 \pm 2$  °C por 18 a 24 horas. Decorrido este período, os testes de VP, nitrato e  $\beta$ -naftil-fosfato (PAL) são revelados utilizando os reagentes específicos presentes no kit e, em dez minutos, a interpretação dos resultados da galeria API® STAPH (Figura 9) é realizada conforme o quadro de leitura (Figura 10). A identificação se faz a partir de um perfil numérico obtido na ficha de resultados onde os testes são separados por grupos de três e um valor de 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. Adicionados em cada grupo os números correspondentes às reações positivas, obtém-se sete algarismos que constitui o perfil numérico (Figura 11) (BIOMERIEUX API®).

Provas bioquímicas para identificação fenotípica de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, realizadas através do sistema API® STAPH: GLU (D-glucose); FRU (D-



frutose); MNE (D-manose); MAL (D-maltose); LAC (D-lactose); TRE (D-trehalose); MAN (D-manitol); XLT (xilitol), MEL (D-melibiose); NIT (redução de nitrato); PAL ( $\beta$ -naftil fosfato); VP (teste de Voges-Proskauer); RAF (D-rafinose); XYL (D-xilose); SAC (D-sacarose); MDG (metil  $\alpha$ D-glucopiranosídeo); NAG (N-acetil glucosamina); ADH (L-arginina) e URE (uréia) (BIOMERIEUX API®).

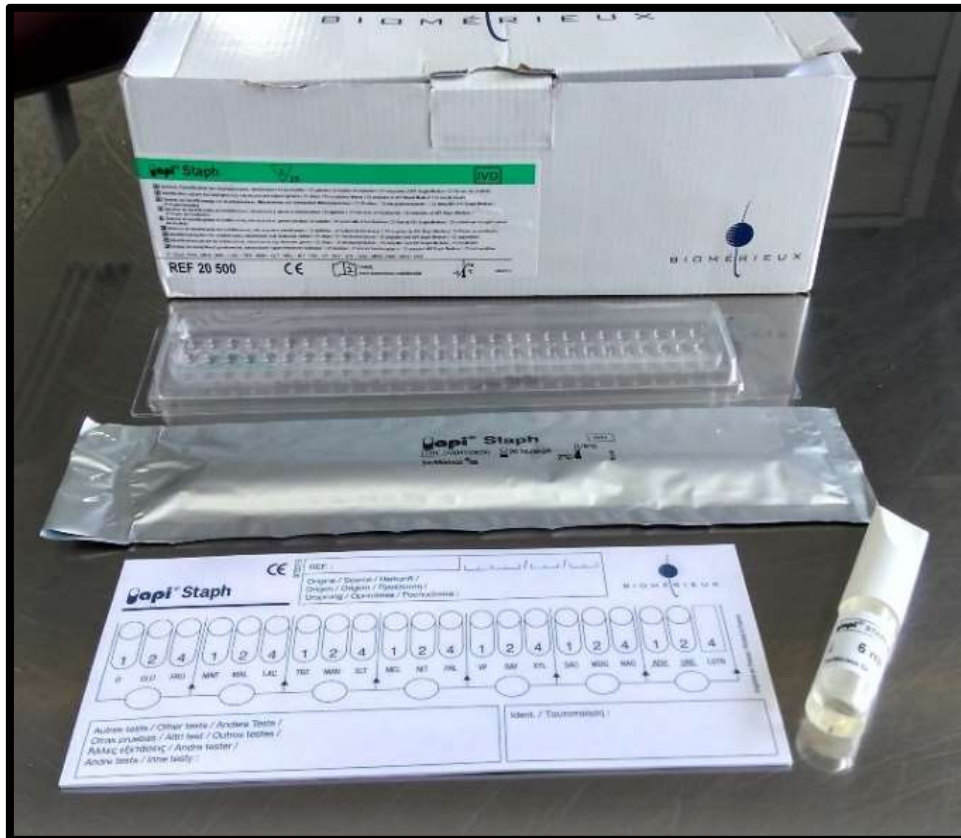


Figura 8 – Kit API® STAPH.  
Fonte: Acervo Pessoal

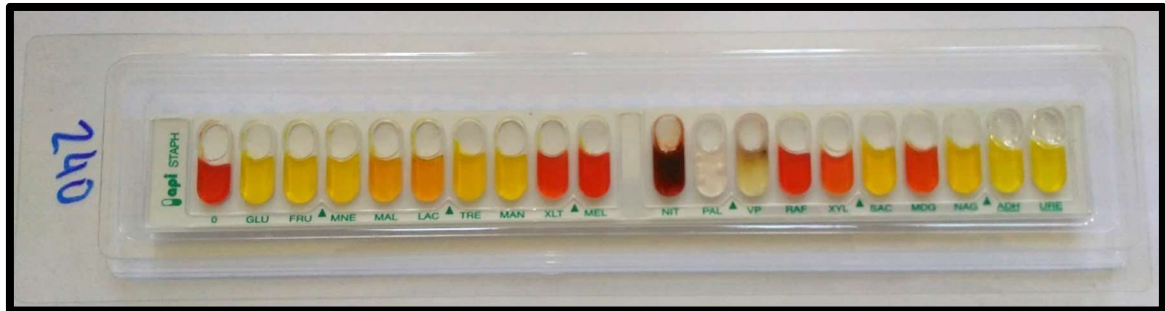


Figura 9 – Galeria API® STAPH incubada – *Staphylococcus sciuri*.  
Fonte: Acervo Pessoal

TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QUANT (mg/cúp.)	REACÇÕES / ENZIMAS	RESULTADO	
				NEGATIVO	POSITIVO
0	Nenhum		Testemunho negativo	vermelho	—
GLU	D-glucose	1,56	(Testemunho positivo) (D-GLUcose)		
FRU	D-fructose	1,4	acidificação (D-FRUctose)		
MNE	D-manose	1,4	acidificação (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidificação (MALtose)		
LAC	D-lactose (origem bovina)	1,4	acidificação (LACtose)	vermelho *	amarelo
TRE	D-trehalose	1,32	acidificação (D-TREhalose)		
MAN	D-manitol	1,36	acidificação (D-MANnitol)		
XLT	xilitol	1,4	acidificação (XLTol)		
MEL	D-melibiose	1,32	acidificação (D-MELibiose)		
NIT	nitrito de potássio	0,08	Redução dos nitratos em nitritos	NIT 1 + NIT 2 / 10 min incolor-rosa pálido   vermelho	
PAL	β-naftil fosfato	0,0244	Fosfatase Alcalina	ZYMA + ZYM B / 10 min amarelo   violeta	
VP	Piruvato de sódio	1,904	produção de acetil metil-carbinol (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incolor-rosa pálido   violeta-rosa	
RAF	D-rafinose	1,56	acidificação (RAFinose)		
XYL	D-xilose	1,4	acidificação (XILose)		
SAC	D-sacarose	1,32	acidificação (SACarose)		
MDG	metil-αD- glucopiranosido	1,28	acidificação (metil-αD- Glucopiranosido)	vermelho	amarelo
NAG	N-acetil-glucosamina	1,28	acidificação (N-Acetil-Glucosamina)		
ADH	L-arginina	1,904	Arginina DiHidrolase	amarelo	laranja-vermelho
URE	Ureia	0,76	UREase	jaune	vermelho-violeta

Os testes de acidificação devem ser lidos por comparação com os testemunhos negativo (0) e positivo (GLU).

\* Os testes MNE e XLT podem ser laranjas, quando cercados ou precedidos por testes positivos. Devem então ser considerados negativos.

• As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias-primas.

• Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente peptonas.

Figura 10 – Quadro de Leitura.  
Fonte: Biomerieux



		REF : <u>240</u>	<u>2016/09/29</u>
CE 0722 B		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	
			
H + + + + + 1 2 4 1 2 4 0 GLU FRU MNE MAL LAC	+ + - H + H 1 2 4 1 2 4 TRE MAN XLT MEL NIT PAL	H H H + H + 1 2 4 1 2 4 VP RAF XYL SAC MDG NAG	H H 1 2 4 ADH LIBE LSTR
6	7	3	2
0	5	0	0
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση : <u>S sciuri</u>	
		97,3%	

Figura 11 – Ficha de Resultados.  
 Fonte: Acervo Pessoal

#### 4.3.4.2. VITEK® 2 Compact

De acordo com o manual de funcionamento do equipamento, VITEK® 2 Compact (Figura 12) é um sistema automatizado de identificação microbiana que utiliza cartões com reagentes colorimétricos, que são inoculados com a suspensão de uma cultura pura de micro-organismos e o perfil de crescimento é interpretado de forma automática. Os cartões possuem 64 compartimentos que contém, cada um deles, um substrato diferente para provas bioquímicas individuais (Figura 13). Com estes substratos se medem diversas atividades metabólicas como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento em presença de substâncias inibidoras. Os cartões são selados em ambos os lados por uma película clara que evita o contato entre as diferentes misturas de micro-organismo/substrato, porém permite o transporte do nível de oxigênio adequado para cada reação. Cada cartão possui um tubo de transferência pré-inserido em sua lateral para a inoculação automatizada com a suspensão bacteriana que o próprio equipamento realiza sem contato manual. Estes cartões têm códigos de barras que contém informações sobre o tipo de produto, número de lote, data de validade e um identificador único que pode ser relacionado com a amostra para rastreabilidade.



Figura 12 – Equipamento VITEK® 2 Compact.  
Fonte: Acervo Pessoal

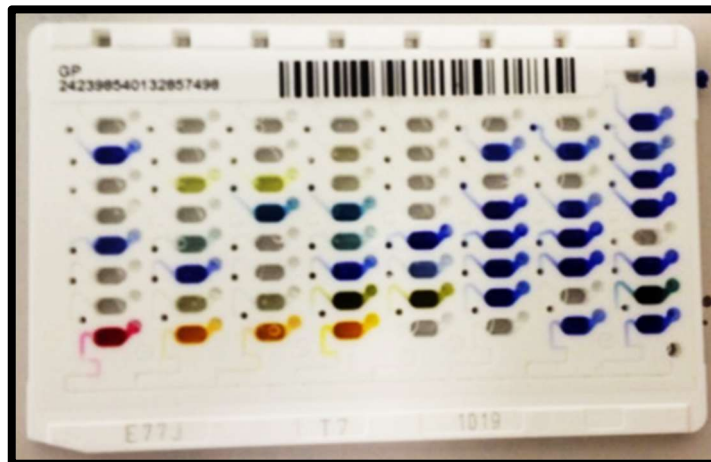


Figura 13 – Cartão GP Inoculado e Incubado - Kit VITEK® 2 Compact.  
Fonte: Acervo Pessoal

No caso de identificação de espécies do gênero *Staphylococcus*, utiliza-se os cartões GP (cocos e bacilos não formadores de esporos e Gram positivos). A suspensão bacteriana é preparada transferindo-se, com alça bacteriológica estéril, a partir de um cultivo puro crescido por 24 horas em ágar TSA, uma quantidade suficiente de inóculo para um tubo de poliestireno claro de 12x75 mm contendo 3 mL de solução salina estéril (solução aquosa de NaCl 0,45% a 0,50% e pH 4.5 a 7.0). A turvação é ajustada para 0,50 a 0,63 unidades da escala de McFarland

utilizando densitômetro DensiChek™ (Figura 14), o que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  micro-organismos/mL. Em seguida coloca-se o tubo de ensaio, com a suspensão bacteriana já ajustada, em cassete próprio do aparelho (Figura 15) e posiciona-se ao lado o cartão a ser inoculado inserindo o tubo de transferência dentro do tubo de ensaio que contém a suspensão bacteriana correspondente (Figura 15). Introduz-se o cassete contendo as amostras no interior do sistema VITEK® 2 Compact.



Figura 14 – DensiChek™.  
Fonte: Acervo Pessoal





Figura 15 – Cartões na Rack de Inoculação.  
Fonte: Acervo Pessoal

No aparelho as amostras são transportadas para uma câmara onde se aplica vácuo e em seguida se reintroduz o ar, essa ação faz com que a suspensão bacteriana passe, através do tubo de transferência, pelos microcanais que chegam a todos os compartimentos-teste preenchendo-os. Os cartões inoculados passam por um mecanismo que corta os tubos de transferência e os selam e são, então, transferidos automaticamente para o carrossel incubador onde ficarão sob temperatura de  $35,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por até 24 horas. Cada cartão é removido automaticamente do carrossel incubador a cada 15 minutos e transportado ao sistema óptico de transmitância, que utiliza diferentes comprimentos de onda do espectro visível para interpretar as reações (por turbidimetria e colorimetria) dos compartimentos-teste e devolve ao seu lugar no carrossel de incubação até a próxima leitura, 15 minutos após. Os dados são registrados em intervalos de 15 minutos durante o período de incubação total. Os cálculos se realizam com os dados brutos e se comparam com os padrões para determinar as reações para cada uma das provas. Os resultados aparecem como “+”, “-“, ou quando as reações são deficientes, estas são indicadas como ”?”.

O aparelho faz a leitura, cálculos e interpretação dos resultados baseados em uma base de dados pré-cadastrada na memória do equipamento e libera a identificação microbiana em porcentagem de acerto (Figura 16). As bases de dados dos produtos de identificação são construídas com grande número de cepas de micro-organismos perfeitamente caracterizados e testados sob várias condições de cultivo. Estas cepas provêm de uma variedade de fontes clínicas e industriais, assim como de coleções de cultura públicas (ex: ATCC) e universitárias (BIOMERIEUX VITEK®; BIOMERIEUX, 2013).

Provas bioquímicas para identificação fenotípica de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, realizadas através do sistema VITEK® 2 Compact incluem: AMY (D-amigadalina), PIPLC (fosfatidilinositol fosfolipase C), dXYLI (D-xilose), ADH1 (arginina dehidrolase 1), BGAL ( $\beta$ -galactosidase), AGLU ( $\alpha$ -glucosidase), APPA (Ala-Fe-Pro arilamidase), CDEX (ciclodextrina), AspA (L-aspartato arilamidase), BGAR ( $\beta$ -galactopiranosidase), AMAN (alfa-manosidase), PHOS (fosfatase), LeuA (leucina arilamidase), ProA (L-prolina arilamidase), BGURr ( $\beta$ -glucuronidase R), AGAL ( $\alpha$ -galactosidase), PyrA (L-pirrolidonil arilamidase), BGUR ( $\beta$ -glucuronidase), AlaA (alanina arilamidase), TyrA (tirosina arilamidase), dSOR (D-sorbitol), URE (uréase), POLYB (resistência a polimixina B), dGAL (D-galactose), DRIB (D-ribose), ILATk (alcalinização L-lactato), NAG (N-acetil-D glucosamina), dMAL (D-maltose), BACI (resistência a Bacitracina), NOVO (resistência a novobiocina), NC6.5 (crescimento em NaCl a 6.5%), dMAN (D-manitol), dMNE (D-manose), MBdG (metil- $\beta$ -D glucopiranosidio), PUL (pululano), dRAF (D-rafnose), O129R (resistência a O/129), SAL (salicina), SAC (sacarose), dTRE (D-trehalose), ADH2s (arginina dehidrolase 2) e OPTO (resistência a optoquina) (BIOMERIEUX VITEK®; BIOMERIEUX, 2013).

Cliente bioMérieux: Nº do Sistema: VK2C6395	<b>Relatório do Laboratório</b>	Impresso a 12/Mar/2016 10:22 BRT Impresso por: microbiologia															
Nome do Doente: Grupo de Isolados: 32-1		ID do Doente:															
Tipo de carta: GP Aparelho de teste: 0000139C2076																	
Bionúmero: 020000010250031 Quantificação de microrganismos:																	
Comentários:																	
Informações da Identificação	Carta: GP	Nº de Lote: 242374740	Data de Validade: 18/Mar/2017 11:00 BRT														
Microorganismo Seleccionado	Concluído: 11/Mar/2016 20:27 BRT	Estado: Final	Hora da Análise: 5,00 Horas														
Microorganismo FRS	99% Probabilidade Staphylococcus saprophyticus		Bionúmero: 020000010250031														
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s)																	
Confiança: Excelente Identificação																	
<b>Detalhes Bioquímicos</b>																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	+	32	POLYB	-	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	-
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	+	53	dMNE	-	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															
Versão do VITEK 2 Systems instalada: 07.01				Norma de Interpretação CMI:				Norma de Interpretação Terapêutica:									
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:				Último Parâmetro AES Modificado:													
Página 1 de 1																	

Figura 16 – Folha Modelo de Resultados do VITEK® 2 Compact.  
Fonte: Acervo Pessoal



#### 4.4. METODOLOGIA DE PCR PARA DETERMINAR OS GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA

Para detecção de genes da enterotoxina estafilocócica (SE) dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativos foram utilizados *primers* descritos por Lovseth et al., 2004, demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1: *Primers* descritos por Lovseth et al., 2004.**

Gene	Sequência de <i>Primers</i>	Amplificação
sea-F	5' GCAGGGAACAGCTTTAGGC 3'	521 pb
sea-R	5' GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG 3'	
seb-F	5' ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG 3'	667 pb
seb-R	5' TGCA3'GGCATCATGTCATACCA 3'	
sec-F	5' CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA 3'	284 pb
sec-R	5' TGCAGGCATCATATCATACCA 3'	
sed-F	5' GTGGTGAAATAGATAGGACTGC 3'	385 pb
sed-R	5' ATATGAAGGTGCTCTGTGG 3'	
see-F	5' TACCAATTAACCTGTGGATAGAC 3'	171 pb
see-R	5' CTCTTTGCACCTACCGC 3'	
seg-F	5' CGTCTCCACCTGTTGAAGG 3'	328 pb
seg-R	5' CCAAGTGATTGTCTATTGTCG 3'	
seh-F	5' CAACTGCTGATTTAGCTCAG 3'	359 pb
seh-R	5' GTCGAATGAGTAATCTCTAGG 3'	
sei-F	5' CAACTCGAATTTCAACAGGTACC 3'	466 pb
sei-R	5' CAGGCAGTCCATCTCCTG 3'	
sej-F	5' CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG 3'	142 pb
sej-R	5' CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC 3'	
<i>tsst</i> F	5' GCTTGCGACAACCTGCTACAG 3'	559 pb
<i>tsst</i> R	5' TGGATCCGTCATTCATTGTTAT 3'	
<i>16S rRNA</i> F	5' GTAGGTGGCAAGCGTTATCC 3'	228 pb
<i>16S rRNA</i> R	5' CGCACATCAGCGTCAG 3'	

F = Forward R = Reverse

A amplificação das amostras foi realizada com a utilização de 10 µL da colônia ressuspensa em água livre de nucleases (*water nuclease free* - Invitrogen) acrescida de 40 µL da mistura de reagentes da PCR. Foram realizadas duas reações (com mix 1 e 2), devido à grande quantidade de primers. Para o mix 1 foram utilizados os seguintes primers na concentração de 25 pmol de cada par de primers dos genes: SED, SEE, SEG, SEI e TSST e para o mix 2: SEA, SEB-SEC, SEC, SEH, SEJ e 16S r RNA, contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl); 2 mM MgCl<sub>2</sub>.

Nessas condições foi empregado ciclo de temperaturas da amplificação: desnaturação inicial 95 °C por 10 minutos, seguida de 29 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, hibridização 68 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Para controle positivo da reação foi utilizada a cepa de *S. aureus* do acervo do Instituto Adolfo Lutz e água deionizada estéril como controle negativo.

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1 µL corante glicerinado (*Blue juice* – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, adicionado de tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA pH 8,0), acrescido de 3 µL, 5 µL ou 10 µL de gel *red* para 25 mL, 50 mL ou 100 mL de gel de agarose 1,5% respectivamente. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *STAPHYLOCOCCUS* spp. PARA DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES.

Das 180 amostras de queijo analisadas foram obtidos 208 isolados presuntivos para o gênero *Staphylococcus* spp. com a utilização de testes como o crescimento de colônias típicas em ágar Baird Parker, características morfotintoriais de cocos Gram positivos em cachos e positividade na reação da catalase em lâmina. Dos 208 isolados, 74 foram obtidos de queijos embalados à vácuo, 67 de queijos embalados com resina e 67 de queijos embalados com atmosfera modificada. Os 208 isolados obtidos foram identificados bioquimicamente (Tabela 2) utilizando as tecnologias VITECK® 2 Compact e/ou API STAPH®, de acordo com a disponibilidade do kit no momento da análise.

**Tabela 2: Resultados das Provas Bioquímicas Comuns ao API STAPH® e ao VITECK® 2 Compact para Identificação Fenotípica dos Isolados**

ESPECIE	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+/-
<i>S. hominis spp hominis</i>	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-	-	+
<i>S. sciuri</i>	+	+	+	+	+/-	+	+	-	-	+
<i>S. xylosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+/-	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. haemolyticus</i>	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	+
<i>S. lentus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>S. warneri</i>	+	+	+/-	+	-	+	+/-	-	-	-
<i>S. equorum</i>	+	+	+	+	+	-	+	+/-	-	+
<i>S. cohnii</i>	+	+	+/-	+	-	+	+	+/-	-	-

ESPECIE	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
<i>S. saprophyticus</i>	-	+	-	-	+	-	+/-	+/-	+/-
<i>S. hominis spp hominis</i>	+/-	+/-	-	-	+	-	+/-	+/-	+
<i>S. sciuri</i>	+/-	+/-	-	-	+	-	+/-	-	-
<i>S. xylosus</i>	+	+/-	-	+	+	-	+	-	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+/-	-	-	+	-	-	+/-	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	+/-	-	-	+	-	+	+	-
<i>S. lentus</i>	-	+/-	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>S. warneri</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>S. equorum</i>	+/-	+/-	-	-	+	-	-	-	+
<i>S. cohnii</i>	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-

OBS: os resultados (+) e (-) refletem o comportamento bioquímico da maioria das cepas da espécie.

GLU (D-glucose); FRU (D-frutose); MNE (D-manose); MAL (D-maltose); LAC (D-lactose); TRE (D-trehalose); MAN (D-manitol); XLT (xilitol), MEL (D-melibiose); NIT (redução de nitrato); PAL ( $\beta$ -naftil fosfato); VP (teste de Voges-Proskauer); RAF (D-rafinose); XYL (D-xilose); SAC (D-sacarose); MDG (metil  $\alpha$ D-glucopiranosídeo); NAG (N-acetil glucosamina); ADH (L-arginina) e URE (uréia).

Conforme demonstrado na Tabela 3 foram analisados 10 lotes de amostras de queijo embalados a vácuo e em seis tempos de prateleira (0, 45, 90, 120, 150 e 180 dias) e os 74 isolados obtidos destes lotes correspondem a 35,6% do total de isolados identificados. A partir do lote 01, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus lentus* e 02 como *Staphylococcus sciuri*. A partir do lote 02, isolaram-se, a princípio, 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus epidermidis* e 02 foram confirmadas como *Aerococcus viridans*, portanto, não se configuram como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, sendo descartadas do trabalho. A partir do lote 03, isolaram-se 09 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 07 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 02 como *Staphylococcus equorum*. A partir do lote 04, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 03 como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*. A partir do lote 05, isolaram-se 09 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus warneri* e 03 como *Staphylococcus xylosus*. A partir do lote 06, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus xylosus* e 01 como *Staphylococcus epidermidis*. A partir do lote 07, isolaram-se 05 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo todas identificadas como *Staphylococcus sciuri*. A partir do lote 08, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* e 02 como *Staphylococcus equorum*. A partir do lote 09, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis* e 02 como *Staphylococcus cohnii*. A partir do lote 10, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 01 como *Staphylococcus xylosus*.

Foram igualmente analisados 10 lotes de amostras de queijo embalados com resina e também em seis tempos de prateleira (0, 45, 90, 120, 150 e 180 dias) e os 67 isolados obtidos destes lotes correspondem a 32,2% do total de isolados identificados (Tabela 3). A partir do lote 01, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus lentus* e 01 como *Staphylococcus sciuri*. A partir do lote 02, isolaram-se, a princípio, 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus epidermidis* e uma foi confirmada como *Aerococcus viridans*, portanto não se tratando do gênero *Staphylococcus*, foi descartada do trabalho. A partir do lote 03, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas

identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 02 como *Staphylococcus equorum*. A partir do lote 04, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 01 como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*. A partir do lote 05, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo todas identificadas como *Staphylococcus warneri*. A partir do lote 06, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus xylosum* e 02 como *Staphylococcus epidermidis*. A partir do lote 07, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 identificadas como *Staphylococcus sciuri* e 02 como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*. A partir do lote 08, isolaram-se 09 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 07 delas identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* e 02 como *Staphylococcus equorum*. A partir do lote 09, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis* e 02 como *Staphylococcus cohnii*. A partir do lote 10, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 01 como *Staphylococcus xylosum*.

Por fim analisaram-se 10 lotes de amostras de queijo embalados com atmosfera modificada e nos seis tempos de prateleira estabelecidos (0, 45, 90, 120, 150 e 180 dias) e os 67 isolados obtidos destes lotes correspondem também a 32,2% do total de isolados identificados (Tabela 3). A partir do lote 01, isolaram-se 09 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus lentus* e 03 como *Staphylococcus sciuri*. A partir do lote 02, isolaram-se, a princípio, 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus epidermidis* e uma confirmada como *Aerococcus viridans*, portanto, não se tratando do gênero *Staphylococcus*, foi descartada do trabalho. A partir do lote 03, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 04 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 03 como *Staphylococcus equorum*. A partir do lote 04, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 03 como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*. A partir do lote 05, isolaram-se 05 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo todas identificadas como *Staphylococcus warneri*. A partir do lote 06, isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 05 delas identificadas como *Staphylococcus xylosum* e 01 como *Staphylococcus epidermidis*. A partir do lote 07, isolaram-se 08 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 identificadas como *Staphylococcus sciuri* e 02 como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*. A partir do lote 08,

isolaram-se 06 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo todas identificadas como *Staphylococcus haemolyticus*. A partir do lote 09, isolaram-se 07 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 06 delas identificadas como *Staphylococcus hominis* spp. *hominis* e 01 como *Staphylococcus cohnii*. A partir do lote 10, isolaram-se 05 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo 04 delas identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e 01 como *Staphylococcus xylosus*.

**Tabela 3: Número de Isolados Obtidos e Identificados**

Total de Isolados	Isolados por Tipo de Embalagem	Nº do Lote	Isolados	Colônias Isoladas e Identificadas	
208 (100%)	Vácuo = 74 (35,6%)	01	08	06: <i>S. lentus</i> **	02: <i>S. sciuri</i> **
		02	07	05: <i>S. epidermidis</i> **	02: <i>Aerococcus viridans</i> *
		03	09	07: <i>S. saprophyticus</i> *	02: <i>S. equorum</i> *
		04	08	05: <i>S. saprophyticus</i> *	03: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *
		05	09	06: <i>S. warneri</i> **	03: <i>S. xylosus</i> **
		06	06	05: <i>S. xylosus</i> **	01: <i>S. epidermidis</i> **
		07	05	05: <i>S. sciuri</i> **	---
		08	08	06: <i>S. haemolyticus</i> **	02: <i>S. equorum</i> *
		09	08	06: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *	02: <i>S. cohnii</i> *
		10	06	05: <i>S. saprophyticus</i> *	01: <i>S. xylosus</i> **
	Resina = 67 (32,2%)	01	06	05: <i>S. lentus</i> **	01: <i>S. sciuri</i> **
		02	06	05: <i>S. epidermidis</i> **	01: <i>Aerococcus viridans</i> *
		03	07	05: <i>S. saprophyticus</i> *	02: <i>S. equorum</i> *
		04	07	06: <i>S. saprophyticus</i> *	01: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *
		05	06	06: <i>S. warneri</i> **	---
		06	07	05: <i>S. xylosus</i> **	02: <i>S. epidermidis</i> **
		07	06	05: <i>S. sciuri</i> **	01: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *
		08	09	07: <i>S. haemolyticus</i> **	02: <i>S. equorum</i> *
		09	07	05: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *	02: <i>S. cohnii</i> *
		10	06	05: <i>S. saprophyticus</i> *	01: <i>S. xylosus</i> **
	ATM = 67 (32,2%)	01	09	06: <i>S. lentus</i> **	03: <i>S. sciuri</i> **
		02	06	05: <i>S. epidermidis</i> **	01: <i>Aerococcus viridans</i> *
		03	07	04: <i>S. saprophyticus</i> *	03: <i>S. equorum</i> *
		04	08	05: <i>S. saprophyticus</i> *	03: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *
		05	05	05: <i>S. warneri</i> **	---
		06	06	05: <i>S. xylosus</i> **	01: <i>S. epidermidis</i> **
		07	08	06: <i>S. sciuri</i> **	02: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *
		08	06	06: <i>S. haemolyticus</i> **	---
		09	07	06: <i>S. hominis</i> spp <i>hominis</i> *	01: <i>S. cohnii</i> *
		10	05	04: <i>S. saprophyticus</i> *	01: <i>S. xylosus</i> **

\* VITECK® 2 Compact      \*\*API® STAPHY

Pode-se então observar que as cepas isoladas, em cada um dos lotes, coincidiram independentemente das embalagens utilizadas na preservação do queijo. Tem-se, então, a presença de duas espécies por lote, conforme Tabelas 3 e 4.

**Tabela 4: Isolados Obtidos e Identificados por Lote nas Três Embalagens**

LOTES	CEPAS ISOLADAS (Nas três embalagens)	ESPÉCIES	
01	23	17: <i>S. lentus</i>	06: <i>S. sciuri</i>
02	19	15: <i>S. epidermidis</i>	04: <i>Aerococcus viridans</i>
03	23	16: <i>S. saprophyticus</i>	07: <i>S. equorum</i>
04	23	16: <i>S. saprophyticus</i>	07: <i>S. hominis spp hominis</i>
05	20	17: <i>S. warneri</i>	03: <i>S. xylosus</i>
06	19	15: <i>S. xylosus</i>	04: <i>S. epidermidis</i>
07	19	16: <i>S. sciuri</i>	03: <i>S. hominis spp hominis</i>
08	23	19: <i>S. haemolyticus</i>	04: <i>S. equorum</i>
09	22	17: <i>S. hominis spp hominis</i>	05: <i>S. cohnii</i>
10	17	14: <i>S. saprophyticus</i>	03: <i>S. xylosus</i>

Neste estudo, obteve-se um total de 10 espécies diferentes de *Staphylococcus* coagulase negativos dentre os 204 isolados identificados, sendo que 46 cepas são de *S. saprophyticus* (22,6%), 27 cepas de *S. hominis spp. hominis* (13,2%), 22 cepas de *S. sciuri* (10,8%), 21 cepas de *S. xylosus* (10,3%), 19 cepas de *S. epidermidis* (9,3%), 19 cepas de *S. haemolyticus* (9,3%), 17 cepas de *S. lentus* (8,3%), 17 cepas de *S. warneri* (8,3%), 11 cepas de *S. equorum* (5,4%) e 5 cepas de *S. cohnii* (2,5%), conforme ilustrado a seguir (Figura 17).

Com relação ao tipo de embalagem (vácuo, resina e atmosfera modificada) não houve diferença de crescimento bacteriano, foi verificado que em todos os tipos de embalagens houve crescimento de *Staphylococcus* spp.

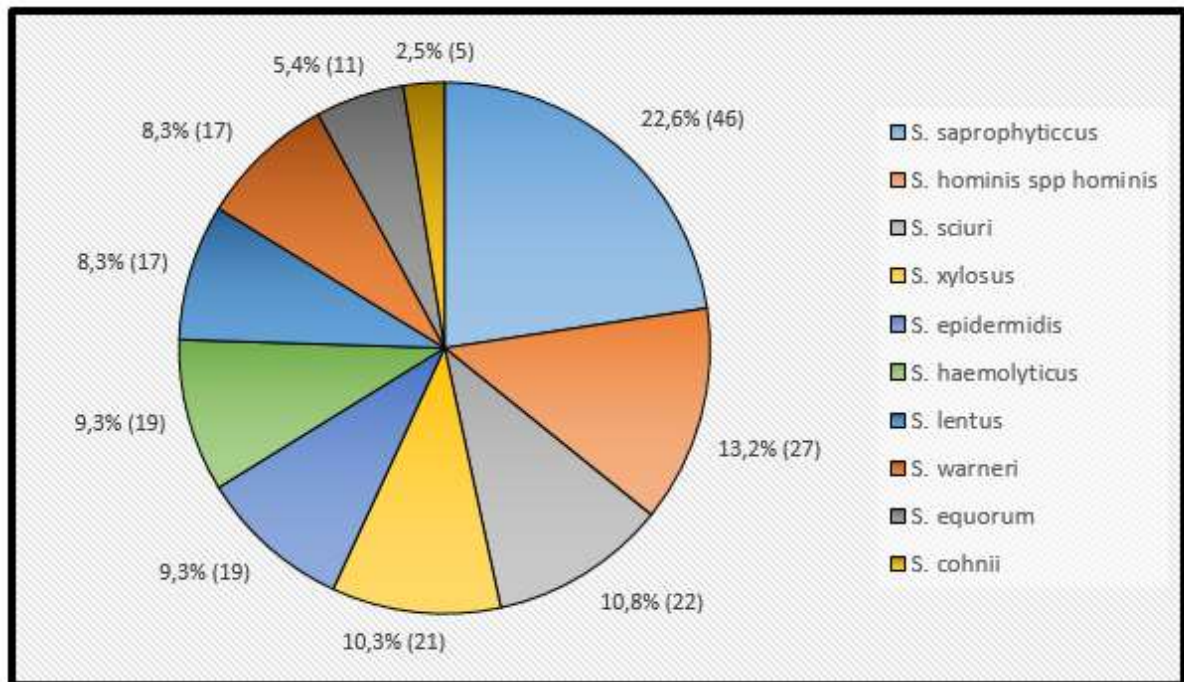


Figura 17: Porcentagem de *Staphylococcus* Coagulase Negativos Isolados e Identificados no Total de Queijos Analisados.

Fonte: Acervo Pessoal

O perfil de espécies identificadas em queijos e apresentadas através dos diversos trabalhos publicados é bem diversificado (BORGES et al., 2008b; LAMAITA et al., 2005; ANDRADE, 2011), mas se relaciona de certa forma, aos achados deste estudo apresentando diferenças entre as frequências de isolamento e o tipo de queijo e semelhanças entre as espécies isoladas.

Borges et al. (2008b), estudaram uma linha de produção de queijo coalho, considerado de média umidade e identificaram no leite cru, que seria utilizado como matéria-prima no processo produtivo, três espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN), sendo elas *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus xylosus*, no leite pasteurizado identificaram *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus saprophyticus* e no queijo coalho *Staphylococcus epidermidis* (37,5%), *Staphylococcus xylosus* (25%), *Staphylococcus cohnii* (6,2%), *Staphylococcus haemolyticus* (6,2%) e *Staphylococcus lentus* (6,2%). Lamaita et al. (2005) isolaram três



espécies de ECN (31%) em leite cru refrigerado, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii*. Em 2011, Andrade et al., analisaram 300 amostras de queijo coalho artesanais e industriais e isolaram 208 cepas de *Staphylococcus* spp., dentre as quais foram identificadas 11 espécies de estafilococos coagulase negativas como segue, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus cohnii* spp. *cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis* spp. *hominis* e *Staphylococcus intermedius*. Entre essas espécies, foi constatada alta frequência de *S. xylosum* (87,5%) e *S. cohnii* spp. *cohnii* (50%) nas amostras de queijo coalho industriais, fato que diverge deste estudo no qual houve a prevalência de *Staphylococcus saprophyticus* (22,6%). Em outro estudo, Cunha et al. (2006) avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de alimentos, incluindo leite e produtos lácteos, e constataram que as espécies de maior ocorrência foram: *Staphylococcus epidermidis* (40%), *Staphylococcus xylosum* (20%), *Staphylococcus warneri* (20%), *Staphylococcus sacharolyticus* (15%) e *Staphylococcus hominis* (5%).

Em um trabalho realizado por De Luca et al. (1997) onde se pesquisou 135 amostras de diversos tipos de queijo, foram isoladas 313 cepas de *Staphylococcus* spp. sendo que as espécies predominantes foram *Staphylococcus hominis* (19,5%), *Staphylococcus xylosum* (19,2%), *Staphylococcus epidermidis* (14,8%) e *Staphylococcus cohnii* (16,3%). Fleming et al. (2010), pesquisaram 45 amostras de queijos (2 do tipo bola, 1 do tipo cheddar, 1 do tipo estepe, 10 do tipo minas, 14 do tipo muçarela, 5 tipo parmesão, 11 tipo prato e 1 tipo provolone) e isolaram de 37 delas as seguintes espécies de ECN: *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus epidermidis*, algumas destas espécies foram isoladas somente neste trabalho dentre os artigos pesquisados. Sena (2000) analisou 90 amostras de queijo coalho e isolou, dentre as 377 cepas de *Staphylococcus* spp., 137 cepas de estafilococos coagulase negativa, assim distribuídas: 96 (25.5%) de *Staphylococcus epidermidis*, 41 (10,9%) e *Staphylococcus hyicus*.

Estudando leite de cabra e queijos produzidos a partir deste leite, Vernozy-Rozand et al. (1996) conseguiram isolar 133 cepas de ECN das quais identificaram 14 espécies diferentes, sendo *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus xylosum*, as espécies predominantes. Interessante notar que, assim como nos isolados deste estudo, Vernozy-Rozand também isolou *Staphylococcus equorum*, espécie não relatada em nenhum

dos demais trabalhos utilizados para referência nesta pesquisados. Em trabalho semelhante também com leite de cabras e seus queijos, Valle et al. (1990) isolaram 342 estafilococos e dentre as espécies coagulase negativas, identificaram *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus lentus*.

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* spp. PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS.

Após submeter os 204 *Staphylococcus* coagulase negativos isolados à identificação molecular obteve-se 190 (93,1%) cepas não produtoras de genes de toxinas e 14 (6,9%) cepas com a presença destes genes, como demonstrado na Tabela 5. Todas as amostras amplificaram o gene *16S rRNA* (Figura 19).

**Tabela 5: Isolados Obtidos por Embalagem e Lote com a Presença de Genes para Produção de Enterotoxinas**

EMBALAGEM	LOTE	CEPA	GENE	TOXINA
ATM	04	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E
	07	<i>Staphylococcus hominis</i> spp. <i>hominis</i>	SEJ	J
	08	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SEE	E
	10	<i>Staphylococcus xylosus</i>	SEC	C
	10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E
RESINA	04	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E
	08	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SEE	E
	10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E
VÁCUO	03	<i>Staphylococcus equorum</i>	SEI	I
	04	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E
	05	<i>Staphylococcus xylosus</i>	SEE	E
	06	<i>Staphylococcus xylosus</i>	SEE	E
	08	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SEE	E
	10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SEE	E

Este estudo evidenciou a presença de genes para produção de enterotoxina E (SEE) em 11(78,6%) dos 14 isolados positivos sendo, 6 *Staphylococcus saprophyticus* (43 %), 3 *Staphylococcus haemolyticus* (21 %) e 2 *Staphylococcus xylosus* (15 %). Dos 3 (21,4%) isolados positivos restantes, em 1 (7%) isolado de *Staphylococcus hominis* spp. *hominis* obteve-se a presença do gene para produção de enterotoxina J (SEJ), em 1 (7%) isolado de *Staphylococcus xylosus*, obteve-se a presença de gene para produção de enterotoxina C (SEC) e em 1 isolado de *Staphylococcus equorum* (7%), obteve-se a presença de gene para produção de enterotoxina I (SEI), conforme demonstrado na Figura 18.

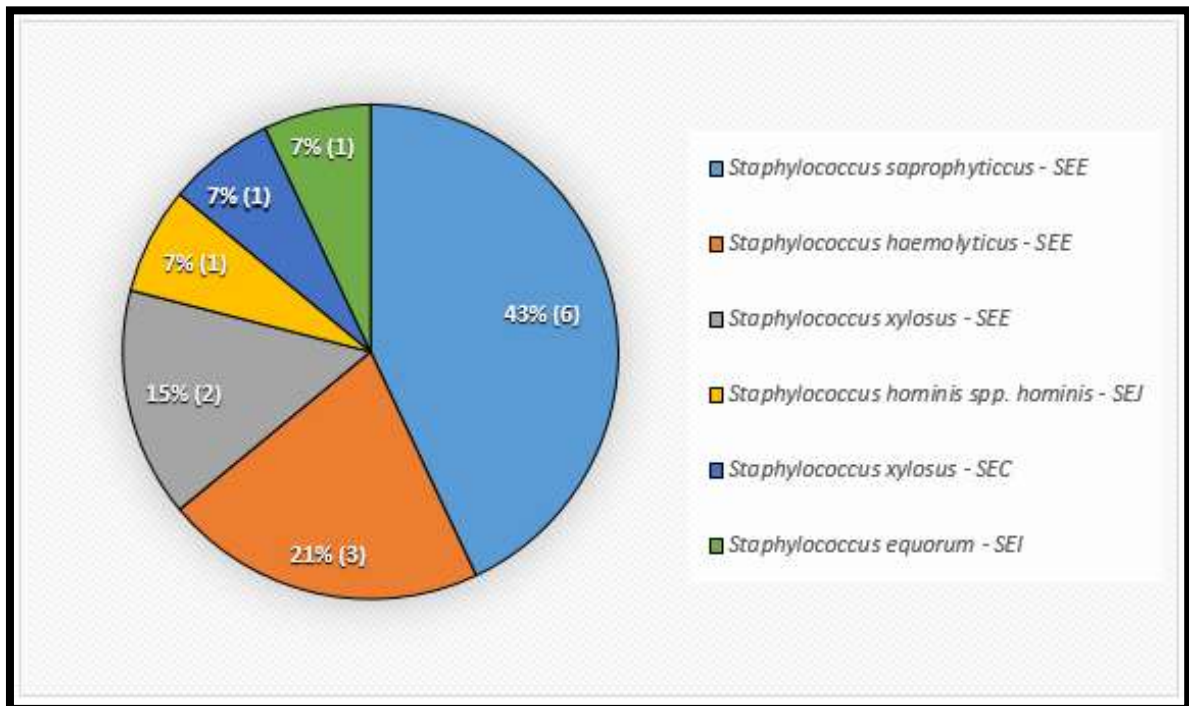


Figura 18: Porcentagem de Espécies e os Respectivos Genes Identificados no Total de Queijos Analisados.  
Fonte: Acervo Pessoal

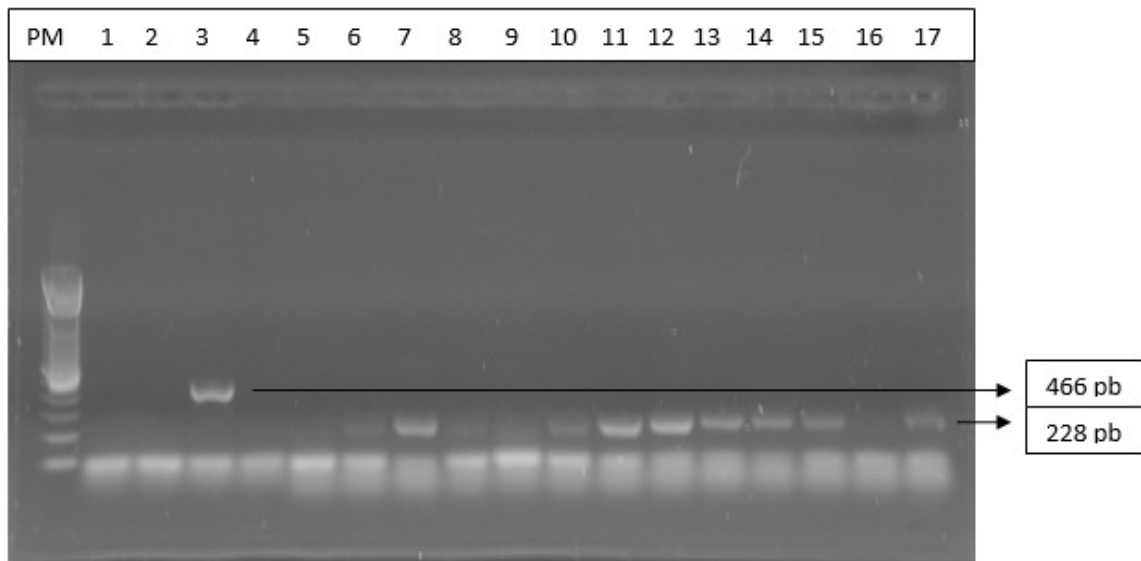


Figura 19 - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para os genes das enterotoxinas em isolados de *Staphylococcus* spp. com amplificação do gene *16SrRNA* (228 pb) e SEI (466 pb).

Fonte: Acervo Pessoal

**PM:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Invitrogen®); **Mix 2 - 1:** Vácuo lote 1; **2:** Resina lote 1; **3:** Vácuo lote 3; **4:** Resina lote 3; **5:** ATM lote 3; **6:** ATM lote 2; **7:** Resina lote 2; **8:** Vácuo lote 2; **9:** ATM lote 6; **10:** Resina lote 7; **11:** Vácuo lote 1; **12:** ATM lote 1; **13:** Vácuo lote 1; **14:** Vácuo lote 2; **15:** Resina lote 1; **16:** Resina lote 5; **17:** controle positivo; **pb:** pares de base.

Do total de 204 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa, em 190 deles (93,1%) não foram detectados genes para produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e em 14 (6,9%) foram detectados tais genes. Lamaita et al. (2005) avaliaram em amostras de leite cru e refrigerado a presença de toxinas estafilocócicas pelo método de OSP (*optimum sensitivity plate*), e constataram que *pools* de 91 (41,3%) dos isolados *Staphylococcus* coagulase negativa produziram algum tipo de toxina, sendo SEA, SEB, SEC e SED além da toxina TSST-1. Em nosso estudo observou-se que a maior incidência de genes para produção de enterotoxina estafilocócica (SE) foi do tipo E (SEE) em 11 (78,6%) das 14 cepas, o que torna nosso estudo inédito, visto que relatamos a possibilidade de produção da toxina E em amostras de queijo do tipo emental (média umidade).

Stamford et al. (2006) analisaram amostras de leite *in natura* comercializados em Pernambuco, nos quais foram isolados 109 *Staphylococcus* spp., e desses 32 foram

caracterizados com *Staphylococcus* coagulase negativa (ECN) com a utilização de provas bioquímicas. Ao realizar o teste de produção de enterotoxinas foi verificado que 11 linhagens (*Staphylococcus carnosus* (1); *Staphylococcus hyicus* (2); *Staphylococcus chromogenes* (4) e 5 ECN, não identificados em espécie, denominados apenas ECN. Dessas cepas, 5 apresentaram linhagens positivas para produção de enterotoxinas com a utilização do Kit Vida Set Staph Enterotoxin (Mini-vidas BioMérieux, Inc France) em leitura de 450nm, porém sem caracterização do tipo de enterotoxina. Apesar da crença de que usualmente espécies de ECN não constituíssem objeto de importância epidemiológica das intoxicações estafilocócicas, as pesquisas afirmam que as espécies não produtoras de coagulase, podem estar implicadas em surtos (PEREIRA et al., 2001). Fato esse, que o estudo conduzido por Oliveira et al. (1999) avaliou em amostras de leite em pó e presunto cozido, 10 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa com potencial enterotoxigênico pertencente às espécies: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus xylosum* e das 10 cepas pesquisadas, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus warneri* produziram enterotoxinas nos alimentos.

Medeiros et al. (2013) realizaram um monitoramento epidemiológico molecular de estirpes de *S. aureus* potencialmente toxigênicas em usinas de produção de queijo minas frescal. Um total de 41 estirpes caracterizadas como *S. aureus* foram testadas para as toxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 a partir da amplificação de fragmentos específicos. Dessas, 25 mostraram-se positivas para as toxinas, com maior frequência de detecção para a toxina SEA. Rapini et al. (2002) evidenciaram genes para produção de enterotoxinas do tipo SEB e SEC em populações de *Staphylococcus* em torno de  $10^4$  UFC/g em queijo coalho comercializado nas praias do Nordeste. Normano et al. (2005) analisaram leite cru e pasteurizado, queijo, coalhada, ricotas, sorvetes e outros derivados de leite e, isolaram 362 cepas de *Staphylococcus aureus*, das quais produziram as toxinas SEA (26,7%), SEB (0,9%), SEC (28,1%), SED (15,7%), SEA e SEB (1,8%), SEA e SED (26%), SEA e SEC (0,5%) e SEC e SED (0,5%).

Todas as 180 amostras de queijo emental analisadas neste estudo obedeciam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a) que traz limites para coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positivos, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, baseados no teor de umidade dos diversos tipos de queijo produzidos, comercializados e consumidos no Brasil e, ainda assim, foram isoladas e identificadas 204 cepas de estafilococos coagulase negativa.

Em geral, na literatura encontra-se diversos trabalhos publicados que divulgam os níveis de contaminação por estafilococos coagulase positiva em queijos de alta umidade e muito alta umidade, pois a umidade favorece a contaminação, proliferação e produção de toxinas por tais agentes nos queijos e fazem deste produto um possível responsável por surtos. A maioria dos trabalhos com estudo de *Staphylococcus* spp. potencialmente toxigênicos envolvem leite e seus derivados com enfoque principalmente em estafilococos coagulase positiva, devido ao fato de que *S. aureus* pertencem a esse grupo e a mastite bovina tem como principal agente causador essa espécie, que desencadeia a contaminação do leite.

Estudos realizados na indústria revelam que a contaminação cruzada dos manipuladores e maquinários é uma via importante para o acesso dos micro-organismos aos produtos a ser considerada. O fato de ter evidenciado a citação de ECN em diversos trabalhos associados com a contaminação em queijos, incluindo o presente estudo que caracterizou estafilococos coagulase negativa com potencial de produção de enterotoxinas, principalmente dos tipos E, I e J e de que há relatos do envolvimento de ECN em surtos (CARMO et al., 2002) e também potencialmente causadores de intoxicação alimentar (RODRIGUEZ et al., 1996; VERNOZY-ROZAND et al., 1996), vem a corroborar as afirmações de Su e Wong (1997), os quais afirmam que a capacidade para a produção de coagulase não pode ser concebida como indicativa de enterotoxigenicidade, portanto, deve-se considerar os ECN como objeto de importância na epidemiologia das intoxicações estafilocócicas e se faz necessária a revisão da legislação brasileira vigente que deveria passar a incluir padrões para esses micro-organismos ou até mesmo a determinação da produção da enterotoxina no alimento estudado, visando a segurança alimentar.

## 6. CONCLUSÕES

Mediante ao trabalho exposto pode-se concluir que:

- Foi identificada a presença de várias espécies de *Staphylococcus* spp. em amostras de queijos tipo emental nos três tipos de embalagens.

- Todas as espécies foram identificadas e classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (ECN);

- Em 6,9% dos *Staphylococcus* identificados no presente estudo foi determinada a presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas do tipo E, I e J, sendo a mais frequente o tipo E, encontrado em 11 das 14 cepas positivas;

- Não foi encontrada nenhuma correlação das espécies isoladas com o tipo de embalagem, pois em todas as embalagens houve proliferação de tais micro-organismos;

- O queijo emental, mesmo estando dentro dos padrões microbiológicos legais pode representar risco para o consumidor devido à presença de *Staphylococcus* spp. potencialmente produtores de toxinas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. ***O maravilhoso mundo dos queijos especiais***. 2012. Acesso em: 08 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imagens/namidia/superhiperjunho2012.pdf>.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Pesquisa sobre consumo e hábitos de compras de queijos no Brasil. 2013**. Acesso em: 8 set. 2015. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Resumo%20final%20pesquisa%20Mintel%20Cheese%20Brazil%202013%20\\_1\\_.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Resumo%20final%20pesquisa%20Mintel%20Cheese%20Brazil%202013%20_1_.pdf).

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Produção nacional de queijos. In: **Evolução do mercado brasileiro de queijos de 2010 a 2014**. 2014. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Mercado\\_2010a2014.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Mercado_2010a2014.pdf). Acesso em: 14 set. 2015.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Importação de queijos**. 2015a. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos\\_Importacao.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos_Importacao.pdf). Acesso em: 14 set. 2015.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Irã, Quênia e Brasil: três mercados a serem acompanhados no segmento do queijo. In: **Mercado internacional de lácteos**. 2015c. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/noticias\\_ler.asp?codigo=1648&codigo\\_categoria=6&codigo\\_subcategoria=5](http://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=1648&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5). Acesso em: 14 set. 2015.

ADAMS, M.; MONTARJEMI, Y. Segurança Básica dos Alimentos para Profissionais de Saúde. Organização Mundial de Saúde. 5ª. Edição. São Paulo: Rocca, 2002.

ADESIYUN, A.A.; TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary Microbiology*. v.9, p.487-495,1984.

ANDRADE, A.P.C., BORGES, M.F., FIGUEIREDO, E.A.T., MACHADO, T.F, PORTO, B.C. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. Fortaleza. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2011.

ARAÚJO, V.S; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.P; ALMEIDA, A.C. F. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.92, n.6, p.1172-1177, 2002.



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

BECKER, K.; KELLER, B.; von EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, dez. 2001.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne Bacterial Pathogens** (Doyle, M.P., ed.). 1989. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 463-523.

BIOMERIEUX API®. Disponível em <

[http://www.biomerieuxusa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPageopen=USA\\_PRD\\_LST&doc=USA\\_PRD\\_LST\\_G\\_PRD\\_USA\\_5&crptprm=ZmlsdGVyPQ==](http://www.biomerieuxusa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPageopen=USA_PRD_LST&doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_5&crptprm=ZmlsdGVyPQ==) > Acesso em 10 de julho de 2016.

BIOMERIEUX VITEK®. Disponível em < <http://www.biomerieux.com.br/> HYPERLINK "http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPagedoc=BRZ\_CLN\_PRD\_G\_PR\_CLN\_8"servlet/srt/bio/brazil/dynPagedoc=BRZ\_CLN\_PRD\_G\_PRD\_CLN\_8H YPERLINK "http://www.biomerieux.com.br/" > Acesso em 10 de julho de 2016.

BIOMERIEUX. Manual VITEK 2: Informação dos produtos dos sistemas VITEK ® 2 Systems, 2013.

BORGES, M. F., ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, sua enterotoxinas e genes associados: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.26, n.1, p.70-86, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em: 03/03/2017. 2016a.

BRASIL. ANVISA. Curso Boas Práticas em Microbiologia – Módulo 4 – Gram Positivos. [http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/control/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_sta.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/control/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_sta.htm). Consultado em 08 de outubro de 2016. 2016b.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº146, de 07/03/1996 Anexo I – Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos**. 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344>>. Acesso em: 11 nov. 2013. 1996.

BRASIL. **Decreto nº 2.244, de 4 de junho de 1997**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF. Seção 1, p. 11555, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. 1999. Disponível em: Acesso em: 05 set. 2007.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**, 2001a. Disponível em:<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 08 nov. 2013.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 124, de 19 de junho de 2001. **Regulamento Técnico sobre Preparados Formadores de Películas a base de Polímeros e/ou Resinas destinados ao revestimento de Alimentos**, 2001b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f50a0e004d8b6bc5aa48ebc116238c3b/ALIMENTOS+RESOLU%C3%87%C3%83O+N%C2%BA+124%2C+DE+19+DE+JUNHO+DE+2001.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 24 set. 2015.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo V**. 2003c. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo IV – Procedimentos para contagem de colônias**. 2003d. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 68, de 12/12/2006 Anexo III – Características sensoriais e preparo de amostras**. 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12396>>. Acesso em: 23 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnica de Coloração de Gram**. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 1997b. 63 p.: iI. (Série TELELAB) 1. Gram I. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, (Brasil). II. Série TELELAB.

BRUN, Y.; FLEURETTE, J.; FOREY, F. **Micromethod for biochemical identification of coagulase-negative staphylococci.** *Journal of Clinical Microbiology*, 1978. 8:503–508.

CARDOSO, F.H.T. **Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais.** 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

CARMO, L.S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* presente in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA A.A.; DIMECH, C.P.; SANTOS, D.A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L.H.; ALVES, R.M.S.; CARMO, E.H. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 a 2004.** *Boletim Eletrônico de Epidemiologia*, v. 5, n.6, p. 1-7, 2005.

CARVALHO, M.P.; VENTURINI, E.E.P.; GALAN, V.B. **As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil.** Portal MilkPoint. Piracicaba, 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 22 set. 2015.

CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC). **Estimates of Foodborne Illness in the United States.** Disponível em <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em 02/03/2017.

CENCI-GOGA, B.T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1693-1696, 2003.

CEPEA-ESALQ. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. **Disputa acirrada por matéria-prima volta a elevar preço ao produtor.** São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/leite/boletim/201.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

CHANG, M.R. et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 7, n. 2, p. 149-160, 2003.

CHENG-CHUN, C.; LI-FEN, C. Enterotoxin production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase-negative strain. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.60, n.8, p. 923-927, 1997.

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

CUNHA, M.L.R.S. et al. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Journal Pediatrics**, v. 78, n. 8, p. 279-288, 2002.

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

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

DE LUCA, G. et al. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.35, n.3, p. 267-270, 1997.

DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**. 2000; 13(1):16-34

DOYLE, M. P. (ed.), 1989. **Foodborne bacterial pathogens**. Marcel-Dekker, New York, NY.

EILERT, S.J. New packaging technologies for the 21<sup>st</sup> century. **Meat Science**, Philadelphia, v.71, n.1, p.122-127, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Estatísticas de consumo**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo.php>>. Acesso em: 23 de março de 2011.

EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus***. 2017. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 27 set. 2017.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. 2004; 34(4):1315-1320.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, É. H. F. de; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, vol.23, p. 162-165, Dezembro, 2003.

FLEMING, L.R.; BOLZAN, D.N.; BANDEIRA, S.O.; NASCIMENTO, J.S. Quantificação e resistência a antibióticos de *Staphylococcus* isolados de queijos. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**. Rio de Janeiro, v.2, n.1/2, 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: ARTMED, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006. 195p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GEMMELL, C. G. & DAWSON, J. E. **Identification of coagulase-negative staphylococci with the API Staph System**. Journal of Clinical Microbiology 1982. 16, 874-877.

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

GERMANO, P.M.L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.6-11, 1993.

GUIMARÃES, T.F.; CARVALHO, G.R.; CARNEIRO, A.V.; DUARTE, M.M. Exportações Mundiais de Queijos: 2003 a 2007. In: X MINAS LEITE. **Sustentabilidade da produção de leite na agricultura familiar**, 10., 2008, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: 2008.

HARIGAN, W. F. Laboratory methods in food microbiology. 3<sup>th</sup> ed. San Diego, CA: Academic Press, 1998. 532p.

HINTLIAN, C.B.; HOTCHKISS, J.H. The safety of modified atmosphere packaging, a review. **Food technology**, Chicago, v.40, p.70-76, 1986.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergery's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HUNT, J. **Produção de queijo sofre desafios na Suíça**. Swissinfo. Berna, 2012. Acesso em: 10 nov. 2013. Disponível em: <[http://www.swissinfo.ch/por/economia/Producao\\_de\\_queijo\\_sofre\\_desafios\\_na\\_Suica.html?cid=33444664](http://www.swissinfo.ch/por/economia/Producao_de_queijo_sofre_desafios_na_Suica.html?cid=33444664)>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamento familiares (POF) 2002-2003**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2002/pof2002.pdf>. Acesso em 09/12/2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Acesso em 05/12/2016. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Acesso em 05/12/2016. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf)>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2007. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 15/06/2015.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

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

KHAMBATY, F. M.; BENNET, R.W.; SHAH, D. B. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a foodrelated outbreak. **Epidemiology and Infection**. London, v. 113, n. 1, p. 75-81, jan. 1994.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n., p. 117-40, 1994.

KOCHANSKI, S.; et al. Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n.4, p. 663-668, out./dez, 2009.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1465p.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.702- 709, 2005.

LANCETTE, G.A. & TANINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington D.C.: AMERICAN PUBLIC HEALTH PRESS. 1992. p.533-550.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the EGC cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal Applied Microbiological**, v.95, p. 38-43, 2003a.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Molecular and Cellular Probes**. 17:227-235. 2003b.

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**. 2003c; 17:139-147

LOVSETH, A., LONCAREVIC, S. & BERDAL, K. G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. **Journal Clinical Microbiology** 42, 3869–3872. 2004.

MANTILLA, S.P.S.; MANO, S.B.; VITAL, H.C.; FRANCO, R. M. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Paraná, v.8, n.4, p.437-448, 2010.

MARTINS, P.C. **O Futuro é leite em excesso**. Portal MilkPoint. Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=33524&actA=7&areaID=50&secaoID=120>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

MAYER, L.; SILVA, W. P. Análise dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos no estado de São Paulo entre 1995 e 2008. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. UTFPR - Campus Ponta Grossa – Paraná, v. 03, n. 02, 2009. ISSN: 1981-3686.

MEDEIROS, E.S., FREITAS, M., PINHEIRO, J.J., SAUKAS, T., KREWER, C., SANTOS, A., COSTA, M. & MOTA, R. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 65:1891-1894, 2013.

MIWA, N.; KAWAMURA, A.; MASUDA, T.; AKIYAMA, M. Na outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 361-366, 2001.

MOTTA, M.R.A.; BELMONT, M.A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializadas em supermercados da região Oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.78/79, p.59-62, 2000.

NETO, A.C., SILVA, C. G. M., STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22(3): 263-271, 2002.

NICOLAU, E. S. et al. Avaliação do potencial de produção e tipo de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* em extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia - GO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 92-101, 2001.

NORMANO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in Food products marketes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v.98, n.1, p.73-79, 2005.

OKURA, M.H.; ARAÚJO, P.F.; JARDIM, F.B.B.; SILVA, R.R.; FINZER, J.R.D. Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo minas frescal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.143, p.84-91, 2006.

OLIVEIRA, A. M. Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase-negativos em alimentos. 1999. 102f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v.30, n.3, p.279-285, 2010.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Zoonoses and veterinary public health. Fact sheets**. Programmes and projects, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/en/>>. Acesso em: 13 nov. 2013.



OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Food safety**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 10 set. 2015.

PARRY, R. T. **Envasado de los alimentos em atmósfera modificada**. Madrid: A. Madrid Vicente, 1993. 331p.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO A.F.; ALMEIDA F.A.; COSTA R.G.B.; SOBRAL D. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e seus efeitos tecnológicos no leite e em produtos lácteos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.67, n.384, p.11-21, 2012.

PEREIRA, M. L., PEREIRA, J. L., SERRANO, A. M., BERGDOLL, M. S. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Higiene Alimentar**. 13(64):24-31, 1999.

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

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Quim. Nova, v.27, n.2, p. 293-300, 2004.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.1, n.26, p.64-69, 2006.

PIMENTEL, F.E.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. et al. Presença de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos e de enterotoxinas em queijo ralado. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.57, p.227-229, 2002.

PONCHIO L. A.; GOMES A. L.; PAZ E. S. **Perspectivas do consumo de leite no Brasil**; São Paulo; Centro de Estudos em Economia Aplicada – CEPEA; 2005.

RAPINI, L.S. et al. 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, 2002.

REIBNITZ, M.G.R. et al. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAasa positivos en queso “colonial” comercializado en el Municipio de Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

ROBERTSON, G. L. Modified atmosphere packaging. In: ROBERTSON, G. L. **Food packaging: principles and practice**. 2006. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=sxzOBQAAQBAJ&pg=PA757&dq=ROBERTSON,+G.+L.+Food+packaging:+principles+and+practice+second+edition&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiU6qjRh93QAhVDW5AKHXQVBzsQ6AEIMjAB#v=onepage&q=ROBERTSON%2C%20G.%20L.%20Food%20packaging%3A%20principles%20and%20practice%20second%20edition&f=false>. Acesso em: 05/12/2016.

RODRIGUEZ, L. et al. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.

SALVADOR, M.; CAMASSOLA, M.; MOSCHEN, E.S.; ZANROSSO, A.V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n.1, p.65-74, 2001.

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

SARANTOPOULOS, C.I.G.L.; ALVES, R.M.V.; MORI, E.E.M. Efeitos da embalagem com atmosfera modificada na preservação de queijo parmesão ralado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.67-79, 1995.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALMEIDA, P.F.; FONSECA, V.M. Presença de *Listeria* spp. no processamento de queijo Minas Frescal em um laticínio da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador, Bahia. **Anais**. Salvador: 1999. p.369.

SMITH, J.P.; RAMASWAMY, H.S.; SIMPSON, B.K. Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Philadelphia, v.1, p.111-118, 1990.

STAMFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.41-45, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1590/S0101-20612006000100007>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1590/S0101-20612006000100007.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**. 60, 195-201, 1997.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Envir. Microbiol.* v. 56, p. 1323-1326, 1990.

VARGAS, C.R.B. Surtos de doenças de transmissão alimentar: A importância da notificação. *Boletim Epidemiológico*. v.16, n.3, 2002.

VERMONT, C. et al. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: two-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2485-2490, 1998.

VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY C., PREVOST, G., LAPEYRE, C., BES, M., BRUN, Y., FLEURETTE, J.. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n.3, p.271-280, 1996.

YARWOOD, J.M.J.; MCCORMICK, J.K.; PAUSTIAN, M.L.; ORWIN, P.M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 – implications for the evolution of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island. **Journal of Biological Chemical**, v.277, p. 13138-13147, 2002.

WILKINSON, J. **Perspectivas do investimento no agronegócio**. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Economia, 2009. 306 p. Relatório integrante da pesquisa “*Perspectivas do Investimento no Brasil*”, em parceria com o Instituto de Economia da UNICAMP, financiada pelo BNDES. Disponível em: <<http://www.projetopib.org/?p=documentos>> Acesso: novembro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. 2015. Disponível: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1). Acesso em 10/04/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety and Foodborne Illness**. Disponível em <http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>. Acesso em 01/09/2016.