

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CAPACIDADE ENTEROTOXIGÊNICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA

DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM

ANIMAL INSPECIONADOS NO BRASIL

Beatris Sonntag Kuchenbecker

PORTO ALEGRE, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Capacidade enterotoxigênica e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados  
de produtos de origem animal inspecionados no Brasil

Beatris Sonntag Kuchenbecker  
Tese apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Veterinárias.  
Área concentração: Microbiologia  
Veterinária. Especialidade:  
Bacteriologia. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

PORTO ALEGRE, 2009.

**K95c Kuchenbecker, Beatris Sonntag**

Capacidade enterotoxigênica e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal inspecionados no Brasil./ Beatris Sonntag Kuchenbecker. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

105 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Orient.

1. *Staphylococcus aureus*: produtos de origem animal
2. Enterotoxina 3. Antimicrobianos: resistência: *Staphylococcus aureus* I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, Orient. II. Título

Beatris Sonntag Kuchenbecker

**Capacidade enterotoxigênica e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal inspecionados no Brasil**

Aprovada em 27 FEV 2009

APROVADA POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADA POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Schmidt

Membro da Comissão

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira

Membro da Comissão

APROVADA POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, sem o qual eu não teria tido forças para realizar nada e sem o qual nada sou.

Agradeço ao meu marido Valter, pelo carinho, amor, apoio, compreensão, companheirismo e estímulo. Esta é mais uma vitória nossa. Te amo!

Agradeço aos queridos filhos Alice, Arthur e Alexandre, que me apoiaram incondicionalmente e, nos momentos mais complicados, simplesmente me deixaram trabalhar e avançar nos meus estudos, sem exigirem nada em troca. Alice e Arthur! Obrigada pelas muitas e muitas vezes em que vocês executaram papel de mãe, cuidando do irmão. Obrigada pelo amor de vocês por mim! Por vocês é que lutei até a conclusão deste trabalho! Amo muito todos vocês!

Aos meus pais, Victor e Margot, por terem me proporcionado tantas coisas, dentre elas a educação, formação e exemplo de vida. Às minhas irmãs, Marta, Vera e Sandra, pelo carinho e amor.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa Cardoso, pela orientação, dedicação e acompanhamento durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Bogo, que mesmo sem ter sido meu co-orientador formal, me orientou, acompanhou, apoiou e ajudou, tendo sempre assumido uma postura otimista e confiante com relação ao trabalho executado. Também a todo grupo do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS, por terem me permitido compartilhar da estrutura, equipamentos e do conhecimento gerado neste laboratório. De forma especial à Cladinara e Josiane.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do LANAGRO/RS, especialmente à Suzana, Aldemir e Mariana, também ao Norton, Marco, Dilma, Beto e Fabiana além de outros que por lá estiveram, pelo carinho, ajuda, companheirismo, amizade, bom humor, paciência, enfim.....Obrigada Suzana, por tantas vezes teres assumido a Responsabilidade Técnica do Laboratório de Microbiologia. Obrigada Mary, por tudo..., valeu o nosso esforço! Obrigada pessoal!

Aos Laboratórios de Microbiologia dos LANAGROS de Recife, Campinas e Belém, de forma especial, aos queridos amigos Dalila, Aldemir, Amaury e Raimunda. Também à Talita (Belém), ao Yuri (Campinas) e à Lúcia (Recife). Muito obrigada pelas cepas e pela ajuda, que foram fundamentais para os resultados deste trabalho, e pela paciência!

À Dr<sup>a</sup>. Dulce T. Schuch, pelo estímulo para realização deste trabalho, pelo exemplo que é como pessoa e profissional, pelo conhecimento que tão carinhosamente compartilhou e continua compartilhando com todos nós. Também agradeço à Lisane, pela amizade e estímulo.

Ao Marcelo, Ronaldo e Roger, do Laboratório de Controle de Vacinas Bacterianas do LANAGRO/RS, pelo apoio e empréstimo do laboratório. Obrigada!

À equipe do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do LANAGRO/RS, o pessoal do “RPM” (Rodrigo, Fabiano, Cristina), pelas risadas e momentos de descontração. “Resolvi finalmente sentar na praça e escrever!”

À Coordenação, Divisão Técnica Laboratorial e Setor de Apoio Laboratorial do LANAGRO/RS, pelo apoio e confiança.

À Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL/SDA/MAPA), especialmente à Josinete, pela compreensão e apoio.

Ao laboratório da coleção de cepas da FIOCRUZ e aos professores doutores Wladimir Padilha da Silva e Marcos Gomes, pela cedência de cepas.

À colega Rosângela U. Salvatori, da UNIVATES e a todo pessoal do laboratório, em especial à Júlia Mallmann, pela ajuda e empréstimo do equipamento “VIDAS”.

## RESUMO

Os produtos de origem animal, produzidos em indústrias brasileiras e inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal, passam por diversos controles, em todas as etapas do seu processamento. Após a industrialização, são submetidos a análises em laboratórios oficiais, para verificação do cumprimento de parâmetros que os definem como aceitáveis ao consumo e isentos de risco. Uma das análises realizadas rotineiramente é a enumeração de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Este microrganismo possui um risco associado a sua presença em grande número, pois alguns deles têm a capacidade de produzir, sob determinadas condições, enterotoxinas termoestáveis, que, ao serem ingeridas, juntamente com o alimento, produzem uma enfermidade. A proposta deste trabalho foi estudar a distribuição das cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de produtos de origem animal das regiões sul, sudeste, norte e nordeste do Brasil e caracterizá-las, com objetivo de estimar riscos de transmissão, através dos alimentos, de cepas resistentes aos antimicrobianos normalmente utilizados em tratamentos de infecções estafilocócicas e investigar a capacidade destas de produzirem as chamadas “enterotoxinas clássicas” (SEA, SEB, SEC, SED e SEE). Os isolados bacterianos foram originários de 3.748 amostras de diversos produtos de origem animal, que foram analisadas em laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no período de 2003 e 2004. Duzentos e quarenta e cinco cepas de *S. aureus*, com diversas quantificações, foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente, através de critérios estabelecidos como padrões nas análises do MAPA e através de outros complementares, para certificação de que se tratavam mesmo de *S. aureus*. Os isolados obtidos foram submetidos ao ensaio imunoenzimático automatizado (ELFA – Enzyme-linked Fluorescent Assay - VIDAS®Staph enterotoxin II SET2), para detectar a capacidade de produzirem quantidades detectáveis das cinco enterotoxinas clássicas (SEs). Entre os isolados positivos no ensaio imunoenzimático, determinou-se a frequência de amplificação, pela Reação em Cadeia da Polimerase, de cada um dos genes respectivos (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*). Posteriormente, foi realizado estudo das resistências dos isolados de *S. aureus* frente a 17 antimicrobianos de importância clínica, pelo método da difusão em ágar. Os isolados foram agrupados de acordo com os perfis de amplificação dos genes das enterotoxinas e pelos perfis de resistência aos antimicrobianos, correlacionando-os com os tipos de alimentos e as regiões nas quais foram encontrados. Oitenta e um isolados produziram quantidades detectáveis de enterotoxinas. Os genes mais frequentemente encontrados foram o *seb* e o *sec-1* (ambos com 76,54%), seguidos do *sea* (61,73%). Apenas quatro dos isolados produtores de enterotoxinas clássicas (três originários de queijo de coalho e um de bacon) apresentaram contagens  $>10^5$ . Em cinquenta e nove cepas (72,84%) houve amplificação de múltiplos genes que codificam enterotoxinas (A-E). Com relação às 81 cepas que produziram enterotoxinas em caldo de cultivo, observou-se que 63 (77,8%) eram provenientes de produtos cárneos, 11 (13,6%) de produtos lácteos, três (3,7%) de pescados e quatro (4,9%) de outros produtos de origem animal. Cinco eram da região norte, quatro da região nordeste, 19 da região sul e 53 da região sudeste. O grupo formado pelo perfil *sea*, *seb* e *sec* combinados foi o mais frequente, com 33 isolados. Vinte e seis cepas deste grupo eram originárias da região sudeste, cinco da região norte e dois da região sul. Oitenta e oito cepas não apresentaram nenhuma resistência aos antimicrobianos testados. As resistências mais frequentes foram frente à penicilina, norfloxacina, canamicina e tetraciclina. Foram formados 64 perfis diferentes de resistência. O perfil mais frequente foi resistência à penicilina, unicamente, seguido de resistência à penicilina/canamicina. A partir dos resultados deste trabalho, pode-se

concluir que o risco de estarem presentes enterotoxinas nos alimentos de origem animal que passam por processos de industrialização controlados e acompanhados pelo Serviço Oficial de Inspeção brasileiro é muito baixo, (somente quatro das 3.748 amostras) Entretanto, uma vez que foram detectados diversos perfis de resistência a antimicrobianos nos isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos, a possibilidade de veiculação e disseminação dessas cepas resistentes, através de alimentos de origem animal, pode existir e deve ser monitorada.

Palavras Chave: produtos de origem animal, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, resistência a antimicrobianos



## ABSTRACT

Food from animal origin produced at Brazilian industries and inspected by the Federal Inspection Service suffer many controls in all stages of their processing. After the industrialization, they are tested in official laboratories for verification of the parameters which define them as acceptable for consumption and free of risk. One of the tests routinely carried out is the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) enumeration. These microorganism have a risk associated with their presence in large numbers. Some of them have the capacity to produce, under certain conditions, heat-stable staphylococcal toxins. If they are ingested with food, they will produce foodborne disease. The aim of this report was to study the distribution and feature of *S. aureus* strains isolated from food animal origin products, in order to estimate risks of transmission of resistant strains to antibiotics commonly used in treatment of staphylococcal infections through food and to investigate their ability to produce so-called "classical enterotoxins" (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). The food samples tested were from different regions of Brazil (south, southeast, north and northeast). From a total of 3,748 food samples, analyzed in official laboratories from Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) between 2003 and 2004, 245 presented different counts of *S. aureus*. They were isolated and characterized phenotypically, using analysis criteria established by the MAPA and through others complementary tests, for guarantee that they are really *S. aureus*. The isolates were submitted to automated immunoassay method (Enzyme-Linked Fluorescent Assay - VIDAS®Staph enterotoxin II SET2) for detection of the strains ability to produce detectable quantities of the five classical enterotoxins (SEs). Among the positive strains in enzyme immunoassay, it was determinate the frequency of amplification, by Polymerase Chain Reaction (PCR), of each of the respective genes (*sea*, *seb*, *sec-1*, *sed* and *see*). Subsequently, it was studied *S. aureus* resistance, by the diffusion in agar method, to 17 clinical importance antimicrobials. The strains were grouped according to the enterotoxin genes and the antimicrobial resistance profiles, correlating them with the types of food and regions which they have been found. Eighty-one strains produced detectable amounts of enterotoxins. The most frequent genes found in those strains were *seb* and *sec-1* (both with 76.54%), followed by *sea* (61.73%). Only four enterotoxin producer strains presented counts  $>10^5$  (three samples of Brazilian cottage-like cheese – "queijo de coalho", and one sample of bacon). In 59 isolates (72.84%) it was observed an amplification of multiple genes encoding enterotoxins (A-E). In relation to the 81 strains that produced enterotoxins in culture broth, we observed that 63 (77.8%) came from meat products, 11 (13.6%) were samples of milk products, three (3.7%) were fish, and four (4.9%) were others products of animal origin. Five samples were from the North, four from the Northeast, 19 from the South and 53 from the Southeast region of Brazil. The most frequent profile was found in 33 strains, and was composed by *sea*, *seb*, and *sec* genes. Twenty-six strains of this group were from Southeast, five from North and two from South Region. Eighty-eight strains did not show any resistance to antimicrobial tested. The highest resistance frequency was observed against penicillin, norfloxacin, kanamycin and tetracycline. Sixty four different resistance profiles could be identified. The profile resistance to penicillin, follow by the profile to penicillin/kanamycin, were the most prevalent. From these results, it is possible to conclude that the risk of having pre-formed enterotoxins in animal derived food items that go through an industrial process, controlled by the Brazilian Official Inspection Service, is very low (only four of 3,748 samples). However, the identification of resistance profiles was detected in *S. aureus* strains. The

possibility of transmission and distribution of these resistant strains through food of animal origin can exist and should be monitored.

Keywords: animal derived products, *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, resistance profile

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – [Tabela 1 artigo 1] Animal derived products analyzed. The number of samples with isolation of <i>S. aureus</i> independent of count is shown in parenthesis .....	52
TABELA 2 – [Tabela 2 artigo 1] Quantification of enterogenic <i>S. aureus</i> and profiles of gene amplification of the enterotoxins A, B, C1, D and E.....	53
TABELA 3 – [Tabela 1 artigo 2] Frequência de isolados resistentes a antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos de produtos de origem animal analisados na rede oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em 2003 e 2004, de acordo com a região de origem dos produtos.....	69
TABELA 4 – [Tabela 2 artigo 2] Perfis de resistência mais prevalentes em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de produtos de origem animal analisados na rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em 2003-2004.....	70

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1: Introdução e Revisão Bibliográfica**

1. Introdução.....14
2. Revisão Bibliográfica.....17

### **CAPÍTULO 2: Artigo 1: Prevalence of enterotoxin producer *Staphylococcus aureus* in animal derived products inspected in Brazil.....30**

### **CAPÍTULO 3: Artigo 2: Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil.....54**

### **CAPÍTULO 4: Discussão Geral.....71**

### **CONCLUSÕES.....77**

### **REFERÊNCIAS.....79**

### **APÊNDICE A: Quadro demonstrativo com os resultados da caracterização bioquímica dos 245 isolados de *Staphylococcus aureus*.....89**

### **APÊNDICES B, C, D, E e F: Imagens dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers dos genes das enterotoxinas.....100 a 104**

### **ANEXO 1: Tabela 1: Seqüência de bases dos primers utilizados nesse estudo e tamanho estimado dos produtos da amplificação.....105**

## **CAPÍTULO 1: Introdução e Revisão Bibliográfica**

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um importante patógeno de humanos e animais, que causa uma grande variedade de doenças, com diferentes graus de severidade, que vão desde uma leve dermatite até pneumonia, osteomielite e septicemia (SALYERS & WHITT, 1994; LOWY, 1998; NORMANNO *et al.*, 2007). Estes problemas tornam-se especialmente preocupantes quando se trataM de cepas resistentes a antimicrobianos (MARTINEAU *et al.*, 2000; NORMANNO *et al.*, 2007; NITZSCHE *et al.*, 2007). Além dos problemas clínicos associados à multiplicação deste microrganismo em tecidos e órgãos de humanos e animais e ao desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos normalmente utilizados nos tratamentos das infecções, existe ainda o risco de doença associada ao consumo de alimentos contaminados com toxinas pré-formadas termotolerantes, produzidas por esta bactéria.

Mais de 250 diferentes doenças transmitidas por alimentos estão descritas até hoje. Destas, aproximadamente dois terços são causadas por bactérias. Dentre as bactérias predominantemente envolvidas nestas doenças, *S. aureus* é um dos principais causadores de gastroenterites causadas por consumo de alimentos contaminados (LE LOIR *et al.*, 2003). Conforme Cunha *et al.* (2006), as toxinas estafilocócicas são a mais envolvidas em doenças alimentares causadas por manipulação de alimentos após o processamento térmico.

A distribuição de *S. aureus* em alimentos é bastante ampla, sendo que estes microrganismos podem ser encontrados em produtos cárneos, grãos e cereais, doces, produtos lácteos, sorvetes, pescados e derivados de ovos. (OPS, 1996; NORMANNO *et al.*, 2007; SIMON & SANJEEV, 2007; AKINEDEN *et al.*, 2008).

Estima-se que nos Estados Unidos, a cada ano, doenças transmitidas por alimentos (DTAs) afetem de 6 a 80 milhões de pessoas, causando mais de 9.000 mortes. A doença provocada pelo consumo de alimentos contaminados com toxinas estafilocócicas é a segunda causa mais comum destas doenças (BALABAN & RASSOLY, 2000).

Dos casos de surtos de DTAs investigados no Estado do Rio Grande do Sul de 1987 a 2000 (RIO GRANDE DO SUL, 2006), 11,3 % tinham como agente etiológico o *S. aureus*, número que está abaixo apenas do agente *Salmonella*, que foi responsável por

34,1 % dos surtos investigados. Este número, provavelmente, não expressa a totalidade dos casos, tendo em vista que muitos surtos não são notificados.

A fabricação de alimentos de origem animal é responsável por uma parcela importante da produção industrial brasileira. O censo agropecuário nos estabelecimentos rurais do Brasil no ano de 2006 revelou os seguintes dados: população bovina: 169.900.049; suína: 31.949.106 e de aves: 1.244.261 (IBGE, 2009). Com relação à produção de leite, observamos que 26.134.000.000 de litros de leite foram produzidos no Brasil em 2007 e 17.800.000.000 de litros foram industrializados em estabelecimentos de laticínios sob inspeção, no ano de 2007 (EMBRAPA, 2009).

Uma das formas de garantir a inocuidade na produção da matéria-prima e dos alimentos é monitorar, através de análises microbiológicas, a qualidade destes. A resolução nº12 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define requisitos microbiológicos para industrialização e comercialização de alimentos no Brasil; e dentre estes está o limite de contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos, que tem critérios de aceitabilidade mínimos para praticamente todos os tipos de alimentos no varejo. A quantidade máxima tolerada de *S. aureus* em amostras de alimentos visa garantir que o número presente no alimento não exceda o limite para produção de quantidades importantes de toxina (BRASIL, 2001). Os “Padrões de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento também definem contagens máximas permitidas de *S. aureus* para diversos produtos (BRASIL, 1996) e se direcionam à indústria. Nas duas legislações citadas, a tolerância está por volta de  $10^3$  (1000) UFC (unidades formadoras de colônia)/g ou mL para produtos cárneos e  $10^2$  (100) ou  $10^3$  (1000) UFC/g ou mL para produtos lácteos. Convém lembrar que esta tolerância está vinculada à condição de que a população destas bactérias se mantenha estável, através de processos que garantam isto, como: refrigeração, embalagens apropriadas, utilização de aditivos alimentares, baixa atividade de água e demais processos que impeçam a multiplicação de microrganismos. Diante disto, torna-se necessário o monitoramento microbiológico por parte das indústrias e dos órgãos fiscalizadores. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza, no Brasil, a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal nas indústrias, através do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Uma das atribuições do SIF é acompanhar a qualidade higiênico-sanitária, através de análises microbiológicas, dos produtos, monitorando, desta forma, os processos de produção dos mesmos.

Quando se fala no risco relacionado à presença e distribuição de microrganismos e em monitoramento das formas de transmissão destes, seja diretamente, em ambientes onde existe concentração de pessoas ou animais, seja através de veículos (instrumentos clínicos, utensílios, etc.), seja através da matéria-prima que dará origem aos alimentos, seja ainda na manipulação destes alimentos, detecta-se a necessidade de aprofundamento de informações a respeito de suas características de crescimento e sobrevivência e das características relacionadas à patogenicidade (como desenvolvimento de resistências e capacidade de produção de diferentes toxinas).

O problema de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos começou a ser discutido quando, na década de 70, médicos foram forçados a abandonar suas convicções de que, com a ampla oferta de agentes antimicrobianos existente, todas infecções bacterianas eram tratáveis (LOWY, 2003). O até então “otimismo” foi abalado com o aparecimento de cepas de *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes. Dados relativos a múltiplas resistências bacterianas têm assustado, cada vez mais, especialistas e a população em geral, e têm demonstrado que as bactérias possuem e desenvolvem mecanismos muito complexos para garantir sua sobrevivência e multiplicação no ambiente e nos hospedeiros.

As técnicas moleculares permitem caracterizar culturas bacterianas isoladas de alimentos. Dentre estas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se mostrado de fácil execução e eficaz como ferramenta de triagem, diagnóstico final confirmatório e caracterização, detectando a presença de genes específicos (JOHNSON *et al.*, 1991; FUEYO *et al.*, 2005; NORMANNO *et al.*, 2007; MORANDI *et al.*, 2007; KÉROUANTON *et al.*, 2007; AKINEDEN *et al.*, 2008; CHIANG *et al.*, 2008).

A partir do exposto, os objetivos deste estudo foram: determinar a prevalência de *S. aureus* isolados de alimentos inspecionados, capazes de produzir enterotoxinas; determinar o perfil de genes que codificam enterotoxinas clássicas presentes e o perfil de resistência desses isolados frente a antimicrobianos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Staphylococcus aureus* é um coco, com tamanho aproximado de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , Gram positivo e catalase positivo (DOYLE *et al.*, 1997). É anaeróbio facultativo e não esporulado, de distribuição mundial, de ocorrência freqüente em diversos tipos de ambientes e superfícies, especialmente na presença de matéria orgânica. Tem capacidade de crescer em temperaturas desde 7 até 48,5 ° C, com temperatura ótima de 30 a 37 ° C e em pH de 4,2 a 9,3, com um ótimo de 7 a 7,5. Pode, muitas vezes, estar presente em tecidos, especialmente epitélio (pele, mucosas nasal e oral) de animais e seres humanos (LE LOIR *et al.*, 2003). Os seres humanos, neste caso, funcionam como portadores destes agentes, transmitindo-os a outras pessoas e aos alimentos que porventura possam estar produzindo ou manipulando, em indústrias e redes de distribuição e de serviços de alimentação, como entrepostos, supermercados, lancherias, restaurantes e outros.

De 25 a 60 % das pessoas são ou foram portadoras de *S. aureus* em um ou outro momento das suas vidas (SALYERS & WHITT, 1994; LE LOIR *et al.*, 2003). Figueroa *et al.* (2002) ao analisarem 102 amostras de swabs da região retrofaríngea de trabalhadores de 19 restaurantes de Santiago, no Chile, encontraram *S. aureus* em 35 deles (34%). Quando presentes em tecidos ou secreções glandulares (ex. leite) de animais, podendo ou não estar provocando mastites clínicas ou subclínicas (TROVÓ *et al.*, 2005; BOYNUKARA *et al.*, 2008), há a possibilidade de transmissão deste agente por via alimentar, especialmente quando este resistir a processos de transformação dos tecidos oriundos destes animais em alimentos, nos matadouros e em indústrias que processam produtos de origem animal (leite, carnes, ovos, pescado). Isto é muitas vezes possível, pois *S. aureus* é bastante resistente a alguns processos que são utilizados em indústrias para destruição ou controle do crescimento de microrganismos, como a salga e a desidratação. Conforme Jay (2005), algumas cepas podem crescer em meios com até 20% de sal, mas o normal é terem crescimento ótimo em concentrações de 7 a 10%. Este mesmo autor cita que em concentrações salinas acima de 12 % a produção de toxina é inibida.

Existe ainda o risco do manipulador contaminar o alimento com a bactéria após o mesmo já haver sofrido processamento térmico (ou outros processos tecnológicos que visam minimizar ou cessar o crescimento bacteriano). Nestes casos, considera-se que existe uma recontaminação do alimento. Isto é bastante comum especialmente em locais onde se realizam operações como embalagem, fracionamento e fatiamento (em produtos

já prontos), e em confeitarias, padarias e estabelecimentos assemelhados, onde determinados produtos, utilizados especialmente como recheios, são elaborados artesanalmente a partir de matéria-prima de origem animal (como por exemplo leite, ovos, etc.). Além disto, após o alimento ser submetido ao processamento, há pouca competição com outros microrganismos, o que favorece a multiplicação de *S. aureus*.

Kuchenbecker *et al.* (2004), relatando resultados de análises microbiológicas realizadas em queijos fabricados em indústrias submetidas à Inspeção Federal, de junho de 2002 a junho de 2004, demonstraram que foi mais comum encontrar resultados não adequados aos parâmetros microbiológicos da legislação vigente (já citada) em queijos fatiados (18,75%) do que em peças inteiras (6,41%), indicando que, quanto maior a manipulação do produto já submetido aos tratamentos que visam reduzir a carga bacteriana inicial, maior é a chance de recontaminação.

Borges *et al.* (2003) verificaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positivos em 93,1% das 43 amostras de queijos de coalho produzidas em microrregiões do estado do Ceará, com contagens que variaram de  $1,0 \times 10^1$  a  $2,0 \times 10^9$ . Lamaita *et al.* (2005) detectaram *Staphylococcus* sp em 100% das 80 amostras de leite cru refrigerado, colhido de tanques de resfriamento de propriedades rurais do estado de Minas Gerais, Brasil, com contagens que variaram de  $1,0 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$ . Ainda neste estudo, foram detectadas, a partir de 138 cepas agrupadas por perfil bioquímico e por origem, 91 produtoras de pelo menos uma das cinco toxinas testadas (Enterotoxinas A, B, C e D e toxina da Síndrome do Choque Tóxico - TSST-1). A possibilidade de que haja produção de enterotoxinas por *S. aureus* em casos semelhantes a estes (extremamente comuns no Brasil) é relativamente grande, uma vez que estão presentes cepas produtoras e que as contagens são suficientemente altas.

*S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais comumente encontradas, sendo de difícil eliminação do ambiente em que convivem humanos e animais. É responsável por muitas infecções nosocomiais, além de ser o principal agente causador da intoxicação alimentar, em virtude da grande variedade de enterotoxinas que produz (MEHROTRA *et al.*, 2000).

Praticamente todas as cepas de *S. aureus* secretam uma ou mais de uma enzima e/ou citotoxina, que incluem hemolisinas, coagulases, nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e colagenases, todas com a função de facilitar a colonização do hospedeiro e a transformação do local para obtenção dos nutrientes exigidos para seu desenvolvimento. Muitas cepas produzem exotoxinas adicionais, que incluem a Toxina

da Síndrome do Choque Tóxico-1 (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas, as toxinas exfoliativas e as leucocidinas (MEHROTRA *et al.*, 2000; HOLECKOVÁ *et al.*, 2002; BANIA *et al.*, 2006; AKINEDEN *et al.*, 2008). A função primária de todas estas seria a inibição da resposta imune do hospedeiro. As Enterotoxinas e TSST-1 também são conhecidas como Toxinas Superantigênicas e Pirogênicas, “pyrogenic toxin superantigens – PTSAGs” (DINGES *et al.*, 2000; BLAIOTTA *et al.*, 2006). As toxinas produzidas por *S. aureus* que estão relacionadas às DTAs, são denominadas com a abreviação SE (Staphylococcal Enterotoxin), seguida de uma letra que representa a designação do sorotipo (SALYERS & WHITT, 1994; BALABAN & RASOOLY, 2000).

As SEs atuam como superantígenos potentes que estimulam proliferação não específica de linfócitos T (T-cell proliferation) (BALABAN & ROSSOLY, 2000; DINGES, 2000). Esta proliferação inespecífica de células T causa imunossupressão no hospedeiro (JARRAUD *et al.*, 2001; BANIA *et al.*, 2006). Balaban *et al.* (2000) afirmam que as enterotoxinas estafilocócicas pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas estafilocócicas e estreptocócicas, com relações filogenéticas, estruturais, funcionais e com seqüências de genes homólogas. Conforme estes mesmos autores, estas toxinas causam síndrome de choque tóxico e tem implicações em doenças alimentares e em muitos tipos de doenças alérgicas e autoimunes.

As enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE são consideradas clássicas por estarem 95% das vezes relacionadas com os surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e por sempre possuírem capacidade emética (BANIA *et al.*, 2006; AKINEDEN *et al.*, 2008).

Holecková *et al.* (2002) afirmam que as toxinas estafilocócicas (SE) são proteínas de baixo peso molecular. Balaban & Rasooly (2000) descrevem que os genes das enterotoxinas codificam precursores das enterotoxinas de aproximadamente 260 aminoácidos.

O gene que é responsável pela produção de SEA, o *sea* (ou *entA*), é carregado por um bacteriófago temperado (BETLEY & MEKALANOS, 1988; BORST & BETLEY, 1994), também denominado profago (BANIA *et al.*, 2006; BLAIOTTA *et al.*, 2006). O gene *sea* é composto por 771 pares de bases – “pb” (BALABAN & ROSSOLY, 2000). SEA e SEE são 83% idênticas (DINGES *et al.*, 2000; BALABAN & ROSSOLY, 2000; LE LOIR *et al.*, 2003). Da mesma forma que SEA, SEE também é codificado por

bacteriófago (BLAIOTTA *et al.*, 2006) ou profago (BANIA *et al.*, 2006; BLAIOTTA *et al.*, 2006).

A região codificadora (coding region) do gene *seb* contém 900 nucleotídeos. O gene *seb* é cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (SCHAFER & IANDOLO, 1978). Em algumas cepas, o gene é carregado por um plasmídeo (BALABAN & ROSSOLY, 2000). O gene *sec* é cromossomal e é codificado na região denominada “pathogenicity islands”, assim como o *seb* (BLAIOTTA *et al.*, 2006). O gene *sec* apresenta 801 pb (BALABAN & ROSSOLY, 2000). O gene *sed* é codificado por um plasmídeo conhecido por PIB485 e contém 774 pb (BALABAN & ROSSOLY, 2000; BLAIOTTA *et al.*, 2006).

Outros tipos de SEs, a SEG, SEH e SEI (também denominadas SEIG, SEIH e SEII) foram descobertos e vem sendo estudados, bem como seus genes correspondentes. Além destes, também foram detectados e descritos os genes *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr*, *selu* e *sely*. Estes genes foram isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes com diversos tipos de infecções (JARRAUD *et al.*, 1999; MEMPEL *et al.*, 2003; SCHERRER *et al.*, 2004). A denominação “staphylococcal enterotoxin-like superantigen” passou a ser usada para estas novas enterotoxinas, pois, apesar de também se mostrarem superantigênicas, estas normalmente não demonstram propriedades eméticas (BLAIOTTA *et al.*, 2006). O produto ativo destes genes é considerado da família das SEs pela similaridade de suas seqüências com as SEs clássicas, apesar de que suas importâncias práticas são ainda desconhecidas e de sua fraca relação com doenças alimentares. Algumas destas SEs, a SEIH, SEII e SEIG (staphylococcal enterotoxin-like superantigens H, I, e G) já demonstraram atividade emética similar às clássicas (CHEN *et al.*, 2004; BLAIOTTA *et al.*, 2004; JORGENDSEN *et al.*, 2005; BANIA *et al.*, 2006; IKEDA *et al.*, 2005; BLAIOTTA *et al.*, 2006; AKINEDEN *et al.*, 2008). Mesmo com esta grande variedade de novas enterotoxinas estudadas e descritas, juntamente com seus genes, somente 5% das doenças alimentares provocadas por *S. aureus* podem ser a elas atribuídas (Bania *et al.*, 2006).

As toxinas produzidas por *S. aureus* são termotolerantes (BERGDOLL, 1983; BALABAN & RASSOLY, 2000), por isto, quando estiverem presentes na matéria prima (exemplo: leite que chega em uma indústria para fabricação de queijo), o processamento térmico que vier a ser aplicado na matéria-prima na indústria, muitas vezes não terá efeito sobre a toxina, mantendo-a intacta.

Jay (2005) descreve que a atividade biológica da SEB fica mantida após aquecimento por 16 horas a 60 °C, em pH 7,3. Valores D para destruição pelo calor de SEB (não purificada), em condições específicas (presença de tampão), variam de  $D_{110}=29,7$  a  $D_{121}=11,4$ .

Técnicas microbiológicas tradicionais são utilizadas para detectar e quantificar *S. aureus* em alimentos. Dentre as mais utilizadas estão o cultivo em meios de cultura com gema de ovo, telurito de potássio, cloreto de lítio e cloreto de sódio, que promovem o crescimento seletivo de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Utilizam-se como provas complementares de diagnóstico: o aspecto das colônias no meio de cultivo, características do microrganismo na coloração de Gram e diversas características bioquímicas destes microrganismos, como a capacidade de produção das enzimas catalase, coagulase e termonuclease e a capacidade de fermentação de determinados açúcares (glicose, manitol, maltose), além da capacidade de produção de acetoina, da sensibilidade à lisostafina, da incapacidade de produção da  $\beta$  galactosidase, da resistência à acriflavina e da produção de pigmentos carotenóides (VARNAM & EVANS, 1991; ROBERSON *et al.*, 1992; GUNN, 1994; HOWARD & KLOOS, 1994; SALYERS & WHITT, 1994; CAPURRO *et al.*, 1999; MAC FADDIN, 2000; BENNETT & LANCETTE, 2001; LANCETTE & TATINI, 2001; GANDRA *et al.*, 2005).

O procedimento de confirmação mais freqüentemente utilizado para *S. aureus* baseia-se na detecção da enzima coagulase. As espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* são coagulase positivos, sendo que os dois últimos são espécies relacionadas aos animais, portanto dificilmente estão presentes em alimentos processados (BENNETT & LANCETTE, 2001). Esta prova é realizada através da exposição de alíquotas (com um volume definido) de culturas deste microrganismo a igual volume de uma solução estéril de plasma sanguíneo, normalmente de coelho. O resultado desta análise é determinado pelo aparecimento ou não de uma reação de coagulação visível na solução final, após um curto período de incubação.

Quando a população de *S. aureus* atinge um nível de  $10^5$  a  $10^6$  por grama, pode ser produzida quantidade de toxina suficiente para provocar a doença de origem alimentar (SHAPTON & SHAPTON, 1991; LE LOIR *et al.*, 2003). Por outro lado, Balaban e Rassoly (2000) afirmam que níveis de 1.000 células/g de *S. aureus* já são capazes de produzir quantidades detectáveis da enterotoxina. Aproximadamente 60%

das cepas de *S. aureus* produzem enterotoxinas clássicas (SHAPTON & SHAPTON, 1991; FIGUEROA *et al.*, 2002).

Além do fator temperatura, a produção de enterotoxinas estafilocócicas por cepas enterotoxigênicas é influenciada por diversos fatores, como o pH do alimento, a concentração de NaCl e a presença de outros microrganismos competidores (BERGDOLL, 1989; LE LOIR *et al.*, 2003).

Conforme Doyle *et al.* (1997), Barber, em 1914, foi o primeiro autor que relacionou uma toxina com a doença causada por *S. aureus* provocada pela ingestão de alimentos, reproduzindo sintomas desta através da ingestão de leite contaminado. Após curto intervalo de tempo da ingestão da toxina, aproximadamente 2 horas, segundo Hobbs & Roberts (1999), ocorrem sintomas gastrointestinais mais ou menos severos, que vão desde vômito e diarreia até desidratação e morte. O principal e mais imediato efeito da toxina parece ser a ocorrência de violentos acessos de vômito, que parecem estar relacionados com o estímulo de terminações nervosas do nervo vago no estômago, o que, segundo alguns autores, caracterizariam a toxina mais como uma neurotoxina do que como uma enterotoxina (SALYERS & WHITT, 1994). Conforme estes mesmos autores, os sintomas diminuem espontaneamente após 24 horas. Holecková *et al.* (2002) citam que, após a ingestão do alimento contaminado, as toxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e ativam reflexo emético, causando náusea, emese, dor abdominal e diarreia. A severidade dos sintomas está associada à quantidade de toxina ingerida e ao estado imunológico em que se encontra a pessoa ou animal que a ingeriu. Esta é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns mundialmente (LONCAREVIC *et al.*, 2005).

A maioria dos relatos de freqüências das enterotoxinas clássicas em surtos de doença estafilocócica transmitida por alimentos, em países como Estados Unidos, Reino Unido e França, relacionam SEA como a mais freqüente (SHAPTON & SHAPTON, 1991; BALABAN & RASSOLY, 2000; KÉROUATON *et al.*, 2007). No Brasil, relatos revelam 70 surtos causados pela enterotoxina estafilocócica, na região de São Paulo, no período de março de 1990 a junho de 1997. Oito cepas representativas foram testadas com um teste de aglutinação em látex – RPLA para capacidade de produção de toxina. Seis delas (75 %) foram positivas para os tipos A e B e dois (25 %) para o tipo B (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2006).

Boynukara *et al.* (2008) isolaram, na Turquia, dentre 480 amostras de leite oriundo de vacas com mastite subclínica, 106 cepas de *S. aureus*. Em vinte e sete

(25,5%) cepas foram detectadas, através da técnica de RPLA, produção de enterotoxinas, sendo que 25 produziram SEA e duas SEB. Nenhuma produziu SEC e SED.

Figuroa *et al.* (2002) detectaram que 54 % das cepas de *S. aureus* isolados de manipuladores de alimentos em restaurantes eram produtoras de enterotoxinas, sendo que a enterotoxina A foi a mais frequentemente encontrada.

Conforme Cunha *et al.* (2006), apesar das enterotoxinas serem produzidas mais comumente por *S. aureus* coagulase positiva, algumas cepas coagulase negativa (Coagulase-negative *Staphylococci* – CNS), envolvidas em infecções humanas e animais tem merecido atenção. Apesar de raramente implicadas em doenças alimentares, por não crescerem rapidamente em alimentos, CNS pode contaminar alimentos, pois humanos também são portadores deste grupo de *Staphylococcus*.

A detecção conjunta de *S. aureus* e de enterotoxinas em alimentos normalmente é difícil, pois os processamentos pelos quais passam os alimentos, em geral, destróem as bactérias sem inativar as toxinas, que são termoestáveis (LONCAREVIC *et al.*, 2005). Métodos normalmente utilizados para detecção das enterotoxinas são baseados em reações imunoenzimáticas (BECKER *et al.*, 1998), utilizando anticorpos mono ou policlonais, ligados a outras partículas (látex, enzimas). No Reversed Passive Látex Agglutination (RPLA) os anticorpos estão aderidos a partículas de látex; nas técnicas de ELISA e ELFA, o complexo antígeno/anticorpo se liga a enzimas que produzem reações colorimétricas ou fluorescentes. Estas técnicas são utilizadas tanto diretamente nos alimentos como nos caldos de cultivo (MORANDI *et al.*, 2007). A ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) aprova a técnica de Técnica de Dupla Imunodifusão em Gel feita em microlâmina (Micro-slide Double Diffusion) para detecção de enterotoxinas e a determina como técnica “standard” para avaliação de outras técnicas para detecção de enterotoxinas em alimentos, que precisam ser no mínimo tão sensíveis ou mais do que esta. O limite de detecção da técnica de Imunodifusão em Gel é de 30-60 ng de enterotoxina por grama de alimento. O Reversed Passive Látex Agglutination (SET-RPLA) possui um limite de detecção baixo (um ng SE mL<sup>-1</sup>) e somente detecta as enterotoxinas de A-D (LONCAREVIC *et al.*, 2005). Métodos baseados em ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) são capazes de detectar sete enterotoxinas: SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE. (BENNETT, 2001). O limite de detecção das enterotoxinas nos alimentos pelo método ELFA, relatada e testada pelo fabricante do sistema VIDAS® Staph enterotoxin II, é de 100%

de detecção, em concentração de 0,5 ng/g (ou ng g<sup>-1</sup>), para as enterotoxinas A e B, 100% de detecção, em concentração de 1,0 ng/g (ou ng g<sup>-1</sup>), para as enterotoxinas C2 e E e de 95% de detecção, em concentração de 1,0 ng/g (ou ng g<sup>-1</sup>), para enterotoxina D (BIOMERIEUX ® SA, 2006). Outros autores realizaram estudos para determinação dos perfis gênicos de cepas produtoras de enterotoxinas, tendo utilizado alguma das técnicas descritas acima para a seleção dos isolados que produziam enterotoxinas (NORMANNO *et al.*, 2006).

O perfil de resistência a antimicrobianos é muito importante quando se trata de isolados de origem clínica; e este tem sido determinado praticamente como primeira forma de caracterização em coleções de culturas de hospitais e laboratórios envolvidos em saúde pública (LESSING *et al.*, 1995; HOOKEY *et al.*, 1999; IP *et al.*, 2003). No caso dos isolados de amostras de alimentos, este perfil também deve ser determinado, pois na medida em que se considera que estes alimentos serão consumidos por humanos e na hipótese de apresentarem contaminação por culturas resistentes, poderão ser uma forma de chegada destes isolados à população humana. O teste baseia-se na utilização de discos impregnados com quantidades definidas dos antimicrobianos, definidas em protocolo padronizado, que são colocados na superfície do meio de cultura com o inóculo (cultura bacteriana). Após o período de incubação, realiza-se a leitura e interpretação, determinando-se a presença e tamanho de halo de inibição (CLSI, 2003).

Na era “pre-antibióticos”, a taxa de mortalidade de bacteremias provocadas por *S. aureus* era de mais de 80%. A introdução da penicilina, no início de 1940, mudou dramaticamente este prognóstico. Entretanto, já em 1942, eram reconhecidas cepas penicilina-resistentes de *S. aureus* nos hospitais. Na década de 60, mais de 80% das cepas, tanto de hospitais como as chamadas “cepas de comunidade” de *S. aureus* eram penicilina-resistentes. Em 1961, surge então a metilina, que foi o primeiro antimicrobiano semisintético penicilase resistente, porém sua introdução foi rapidamente seguida de relatos de cepas “metilina-resistentes” (LOWY, 2003).

Chambers (2001) trata com preocupação do fato de que cepas metilina-resistentes de *S. aureus* (MRSA), que até a década de 80 eram restritas aos hospitais e clínicas médicas, terem se disseminado entre a comunidade, demonstrando a transformação da epidemiologia deste microrganismo. Conforme este autor, humanos são os reservatórios naturais de *S. aureus* e a colonização assintomática é mais comum do que a infecção. A colonização nasofaríngea, na área de períneo ou na pele, especialmente quando esta está danificada, é comum de ocorrer logo após o nascimento.



*S. aureus* é, no contexto de desenvolvimento de resistências, o microrganismo que mais causa preocupação, por sua virulência intrínseca, sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais e sua habilidade de causar infecções graves, com risco de vida. Ao mesmo tempo, este microrganismo é citado como o que mais causa infecções nosocomiais (LOWY, 2003). Mylotte *et al.* (1987) relatam que a taxa de mortalidade resultante de bacteremias por *S. aureus* é de de 20 a 40%.

Biedenbach *et al.* (2007) descrevem que, apesar dos esforços para o desenvolvimento de antimicrobianos direcionados a patógenos Gram positivos, os perfis de suscetibilidade de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* têm continuado a declinar, assim como os mecanismos de resistência tem surgido logo após a introdução e o uso dos novos antimicrobianos.

Quando se trata de isolados originários de alimentos de origem animal, a resistência das cepas encontradas pode ser devida principalmente a dois fatores, levando-se em consideração a origem destes isolados. O primeiro seria quando se considera que a origem dos isolados (*S. aureus*) é a matéria-prima do produto (ex: carne, leite), o que não é difícil de imaginar, pois muitos produtos, ao serem industrializados, não passam por processamentos complexos, capazes de reduzir significativamente contaminações bacterianas. Neste caso, a tendência é que as cepas tenham desenvolvido suas resistências a partir de fatores de risco associados à criação dos animais, como medicações utilizadas em tratamentos e em profilaxia. Como exemplo destes casos, poderíamos citar carne “in natura”, somente refrigerada ou congelada, especialmente de espécies com sistemas de criações mais intensivas, como aves e suínos. A outra seria quando se considera que a origem dos isolados seriam manipuladores da matéria-prima, os alimentos parcialmente prontos ou já prontos e os equipamentos relacionados com todas as etapas de industrialização dos produtos. Neste caso, a resistências das cepas seriam originárias dos fatores associados aos humanos, como tratamentos a que possam estar submetidos. Como exemplos, teríamos alimentos com processamentos mais complexos, normalmente prontos para o consumo (cozidos, curados, defumados, carnes moídas, produtos fatiados, etc.). Esta diversidade de origens pode ser comprovada por biotipificação de cepas, que determina a origem dos isolados bacterianos de alimentos, já utilizada em diversos estudos onde as amostras eram produtos de origem animal (NORMANNO *et al.*, 2007; MORANDI *et al.*, 2007; KÉROUANTON *et al.*, 2007).

Vários trabalhos, recentemente, têm aprofundado estudos de transmissões de resistências através de cepas de *Salmonella* SP (EFSA, 2008; NÓGRADY *et al.*, 2008;

MÜRMAN *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (NAGACHINTA *et al.*, 2009), *Listeria* sp (FILIOUSIS *et al.*, 2009) *Campylobacter* (EFSA, 2008) e *Staphylococcus* (AARESTRUP, 2006; ZELL *et al.*, 2008) originárias de alimentos, demonstrando a importância desta forma de transmissão.

Kérouanton *et al.* (2007), ao realizarem estudo com 178 isolados de *Staphylococcus* originários de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos na França, comentam que, apesar de não ser o método adequado para tipificação de cepas destes tipos de surtos, o estudo da resistência a antimicrobianos é uma preocupação importante de saúde pública, pois humanos podem se infectar com bactérias multiresistentes presentes nos alimentos. Conforme já relatado por Chambers (2001), as cepas resistentes não estão mais restritas aos hospitais, tendo se disseminado entre pessoas da comunidade que não tiveram nenhum fator de risco conhecido, como contato com hospitais ou clínicas ou ainda tenham passado por terapia antimicrobiana, para justificar colonização por cepas resistentes. Um estudo realizado em dois centros de cuidados infantis (creches), em 1998, no Texas, nos Estados Unidos da América, mostrou que 3 a 24 % das crianças saudáveis eram portadoras de *S. aureus* penicilina-resistente (ADCOCK *et al.*, 1998). Conforme Kim *et al.* (2006), virulência e resistência a antimicrobianos são importantes determinantes da manifestação clínica e do tratamento das infecções bacterianas.

A técnica de Disco-difusão tem sido rotineiramente utilizada para caracterização de cepas de *S. aureus* de diversas origens (MARTINEAU *et al.*, 2000; RAPINI *et al.*, 2004; DANTAS *et al.*, 2006; KÉROUANTON *et al.*, 2007; NORMANNO *et al.*, 2007). Além disto, Martineau *et al.* (2000), ao realizarem estudo de resistências à oxacilina, eritromicina e gentamicina, por PCR multiplex, com 206 cepas de *S. aureus* e 188 cepas de *S. epidermidis* (394 no total, todas de origem clínica), encontraram elevado índice de correlação entre os resultados da presença dos genes responsáveis pelo desenvolvimento das resistências por PCR e dos resultados da análise fenotípica, por disco-difusão: 98% para resistência à oxacilina, 100% para gentamicina e 98,5% para eritromicina.

Para tentar corrigir este caminho, que por vezes parece sem volta, numerosas manifestações, conforme relata Livermore (2007), demonstram e justificam a necessidade de diminuir o uso de antimicrobianos em geral e conduzir o uso dos mesmos da forma o mais correta possível, adotando-se, cada vez mais, medidas profiláticas eficazes para diminuir a necessidade do seu uso.

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos são baseados em quatro fatores: 1) interferência na síntese da parede celular bacteriana 2) interferência na função da membrana citoplasmática 3) interferência na síntese de ácidos nucléicos e 4) inibição da síntese protéica. No primeiro grupo, atuando como inibidores de enzimas biossintéticas, estão: penicilinas, cefalosporinas, ciclosserina, fosfomicina. Ainda neste grupo, combinando-se com moléculas transportadoras, está a bacitracina e, com substratos, está a vancomicina. O segundo grupo tem três subdivisões: 2.1) Os que causam desorganização na membrana citoplasmática. Neste grupo estão os polipeptídicos e os poliênicos; 2.2) Os que produzem alterações específicas na permeabilidade dos cátions; 2.3) os que inibem as enzimas da membrana envolvidas na transferência de energia. No terceiro grupo estão antimicrobianos que interferem no metabolismo de nucleotídeos, que interferem na transcrição do DNA e os que inibem a RNA polimerase, entre eles a rifampicina. No quarto grupo, atuando como inibidores da síntese protéica, na fase inicial, de alongamento ou terminal, estão: aminoglicosídeos (ex: estreptomicina, canamicina e gentamicina), clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

As sulfas pertencem a um grupo denominado “inibidores da via metabólica do folato”. São análogos estruturais do ác. *p*-aminobenzóico – PABA, que é essencial para a síntese de ácido fólico nas bactérias. O folato é necessário para síntese de precursores do DNA e RNA nas bactérias. O mecanismo de ação da quinolonas é a inibição da DNA girase e da topoisomerase IV bacteriana. Uma diminui a estrutura superespiral da dupla hélice e a outra separa as duas cadeias do DNA, permitindo, assim, a transcrição ou replicação (SHLAES *et al.*, 1997; LOWY, 2003).

O mecanismo de ação da nitrofurantoína ainda é pouco conhecido. O desenvolvimento de resistências contra ela é raro e não há resistência cruzada. Sua atividade parece estar vinculada à redução da atividade enzimática da célula bacteriana, e esta redução parece permitir a ligação a uma proteína ribossomal (GARAU, 2008)

A ação antimicrobiana da linezolida (oxazolidinona) também é por inibição da síntese protéica, em sítios não utilizados por outros antimicrobianos (Subunidade 50S do ribossoma) (LOWY, 2003; VERA-CABRERA *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência de *S. aureus* aos betalactâmicos podem ser por duas formas: inativação (clivagem do anel beta-lactâmico) através da enzima beta-lactamase ou penicilase, mediada pelo gene *blaZ*, que pode ser cromossomal ou plasmidial; ou alteração da proteína específica de ligação destes (*penicillin-binding*

*protein- PBP*) na bactéria, que a substitui por outra PBP, com bem menos afinidade por este antimicrobiano. É mediada pelo gene *mecA*, que é cromossomal. O mecanismo de resistência de *S. aureus* às quinolonas deve-se à alteração do complexo DNA-enzimático denominado: “Quinolone resistance-determining region” – QRDR, por troca de aminoácidos, resultando em uma redução de afinidade deste por estes antimicrobianos. Os genes da resistência são o *parC* e o *gyrA* ou *gyrB*, sendo que ambos são cromossomais. A resistência aos aminoglicosídeos deve-se à inativação destes por fosforilação ou acetilação enzimática. É freqüentemente codificado por genes plasmidiais. A estratégia bacteriana para resistência às sulfas é uma superprodução de PABA. O mecanismo de resistência para oxazolidinonas é modificação da subregião 23S rRNA, componente da região 50S do ribossomo, interferindo na ligação do antimicrobiano nesta região. A resistência à vancomicina é devida a uma modificação e superprodução dos tripeptídeos que contém os substratos para síntese da parede celular bacteriana, tornando a parede mais espessa e diminuindo a chance de entrada da vancomicina na célula. Ao mesmo tempo, a estrutura terminal deste vai sendo modificada, para “enganar” as moléculas de vancomicina (SHLAES *et al.*, 1997; LOWY, 2003).

Muitos estudos correlacionam perfis de resistência das cepas de *S. aureus* isoladas de diversas origens, ou resistência a um antimicrobiano em particular, normalmente a chamada “meticilina resistência”, ao perfil gênico para produção de enterotoxinas, tanto as clássicas como as “like-enterotoxins” (KWON *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2007). Outros autores ainda correlacionam outros fatores, como capacidade de produzir hemólise (MORGAN, 2008); fagotipificação (CHA *et al.*, 2006) e tipificação sorológica pela coagulase (que determina a que “grupo” ou “tipo” epidêmico de coagulase pertence a cepa) com o perfil genotípico para produção de enterotoxinas e perfil genotípico de resistências a antimicrobianos. A tipificação sorológica pela coagulase (tipos I a X) tem sido indicada e utilizada para investigação epidemiológica de doenças estafilocócicas transmitidas por alimentos (CHA *et al.*, 2006; MONN *et al.*, 2007).

Os métodos convencionais usados para tipificação molecular voltada para estudos epidemiológicos de cepas de *S. aureus* são: análise direta do genoma bacteriano através de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Random Amplified Polymorphic DNA Analysis (RAPD), sequenciamento e análise de polimorfismo de genes escolhidos, ribotipificação e Multilocus Sequence Typing (MLST), que permite avaliar e estudar a

clonalidade e história dos caminhos evolutivos de forma mais detalhada destas bactérias. Para este fim, especialmente analisando polimorfismos em regiões do DNA bacteriano, também tem sido usadas as técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism), cada uma delas aumentando a reprodutibilidade e sensibilidade em relação à anterior (McLAUCHLIN *et al.*, 2000; LE LOIR *et al.*, 2003; LONCAREVIC *et al.*, 2005; TROVÓ *et al.*, 2005; CHA *et al.*, 2006).

**CAPÍTULO 2: ARTIGO 1: Prevalence of enterotoxin producer *Staphylococcus aureus* in animal derived products inspected in Brazil**

SUBMETIDO: FOOD MICROBIOLOGY, JAN 2009. (INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, MAR 2009).

**Prevalence of enterotoxin producer *Staphylococcus aureus* in animal  
derived products inspected in Brazil**

Beatris Sonntag Kuchenbecker<sup>1,2</sup>, Mariana Giménez Priore<sup>2</sup>, Josiane Bettim Bandinelli<sup>3</sup>,  
Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso<sup>1</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul, Estrada da Ponta Grossa 3036, Belém Novo, CEP 91780-580, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Partenon, CEP. 90.610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Running title: S. aureus* enterotoxins in animal derived products

*\*Corresponding author:*

[mbogo@pucrs.br](mailto:mbogo@pucrs.br) (M. R. Bogo)

## Abstract

The present study was carried out to verify the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in animal derived food items produced in industries inspected by the Brazilian Official System. It also investigated the capacity of isolated strains of producing classical Staphylococcal Enterotoxins (SEs) (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). From a total of 3.748 analyzed food samples, between 2003 and 2004, 245 (6.5 %) presented different counts of *S. aureus*. All isolates were biochemically characterized and submitted to the ELFA automated method (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (VIDAS® SET2) for detection of SEs. All 81 strains that produced SEs, were submitted to a Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of the genes *sea*, *seb*, *sec-1*, *sed*, and *see*. The most frequent genes found in those strains were *seb* and *sec-1* (both with 76.54%), followed by *sea* (61.73%). Only four enterotoxin producer strains presented counts  $>10^5$  in animal derived food items (three samples of Brazilian cottage-like cheese “queijo de coalho” and one sample of bacon), with a risk of enterotoxin production in these food items. Thus, it is possible to conclude that the risk of having pre-formed enterotoxins in animal derived foods that are industrialized and controlled by the Brazilian Official Inspection Service is very low.

*Staphylococcus aureus*, SEs, animal derived food, ELFA, PCR strategy



## 1. Introduction

The presence of *S. aureus* is an important indicator of the hygiene and sanitary quality of the animal derived foods, and its enumeration is included in the sanitary legislation of several countries. High population numbers of this bacterium in the food impose the risk of production of enterotoxins that cause one of the most common food related diseases reported worldwide (Normano et al. 2005, Kerouaton et al. 2007, Simon and Sanjeed 2007, Chiang et al. 2008).

According to Bennet and Lancete (2001), the presence of *S. aureus* or its enterotoxins in processed foods is generally related to insufficient sanitization of equipments or to the inadequate manipulation of the raw material, ingredients and final product (Le Loir et al. 2003, Bania et al. 2006). In the food item, strains with a toxigenic capacity could produce different types of enterotoxins (SE), and the ones classified as classic (SEA, SEB, SEC, SED and SEE) have been responsible for the great majority of the outbreaks (Bania et al. 2006, Akineden et al. 2008). The genes that codify classic enterotoxins could be carrying by phages (Betley and Mekalanos 1988, Borst and Betley 1994, Bania et al. 2006, Blaiotta et al. 2006), in plasmids (Shalita et al. 1977, Balaban and Rossoly 2000) or could be present in the bacterial chromosome (Schafer and Iandolo 1978, Fitzgerald et al. 2001, Blaiotta et al. 2006).

In Brazil, the innocuity of food items began to be monitored in 1950 (Brasil 1950, Brasil 1952), becoming mandatory the industrial and sanitary inspection of animal derived products. The Federal Inspection Service (Serviço de Inspeção Federal - SIF) was created to execute this monitoring and to follow the whole production process. The microbiological quality of the products, verified by different analyses, plays an important role in this evaluation and becomes effective by the sampling performed by

the federal inspectors (Fiscais Federais Agropecuários), who send the samples to standard official laboratories. Laboratory assays for the enumeration of *S. aureus* are done routinely in almost all categories and types of foods, except commercially sterile foods, fluid milk, fermented milk, whole eggs and raw meats that are not vacuum packed, and follow the acceptability criteria established by the government recommendation for milk derived products (Brasil 1996), and by the Federal Resolution RDC (Resolução Diretoria Colegiada) N° 12 for meat derived products (Brasil 2001).

Epidemiological data demonstrated that up to 41.2% of disease outbreaks transmitted by food items registered in Brazil, were caused by *S. aureus* (Van Amson et al. 2006). These numbers, probably, do not represent all occurrences, since the majority of the outbreaks are not reported. Factors related to the hygiene in manipulation and to deficiency of storage of the food items, in the presence of enterotoxin producer *S.aureus*, have been pointed out as the main precursors of the outbreaks. However, the investigation of the toxigenic capacity of the strains isolated from food items involved in outbreaks or commercialized in the country has been only conducted in isolated studies that do not include different products from all the regions of the country (Rall et al. 2008).

Therefore, the main goal of the present work was to study the prevalence of *S. aureus* in animal derived products that are inspected by the official Brazilian network, characterizing the strains according to their ability to produce classical enterotoxins.

## 2. Material and Methods

### 2.1 *Sample origin and collection*

The analyzed food items were sent to the laboratories of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento of Brazil (MAPA), between 2003 and 2004, to verify microbiological conditions. Food items were all meat derived (raw, cured, matured, desiccated products and bovine, ovine, caprine, equine and pork meat), milk derived (powder milk, powder milk serum, cream, dulce de leche, condensed milk, butter, cheeses, and milky deserts), fish and derived products, and sporadic samples of other products according to Table 1.

All samples were sent to government laboratories after being collected in the industries by an official representative of the Federal Inspection Service, and were transported in standard conditions that assured the integrity of wrappings as well as the maintenance of temperature and other conditions as indicated in each product. In the laboratory, all data related to the samples were checked to assure the ideal conditions for the development of the laboratory assays. Analyses started up to 24 hours after the arrival of the food samples in the laboratory.

### 2.2 *Isolation of Staphylococcus aureus*

For each sample the quantification of Colony Forming Units (CFU) or Most Probable Number (MPN) of *Staphylococcus aureus* was performed according to “Official Analytical Methods for Microbiological Analyses to Control Animal Derived Products and Water” by MAPA, according to the Instruction nº 62/2003 (Brasil 2003). The MPN technique is used for food items where the concentration limit of *S. aureus* is less than 100 CFU/g, as indicated by the legislation.

Potential colonies growing in agar Baird Parker were confirmed according to characteristics defined in the official methodology of MAPA: typical or atypical growth in agar Baird Parker, Gram staining, catalase production, coagulase and production of thermonuclease. Confirmed colonies were submitted to a complementary biochemical characterization: growth capacity in Agar Baird Parker enriched with 7 µg/mL of acriflavin, production of β-galactosidase in ONPG broth – Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside, capacity of production of carotenoid pigments in Agar PCA (Plate Count Agar), and capacity of fermenting maltose and anaerobic fermentation of mannitol (Roberson et al. 1992, Capurro et al. 1999, Gandra et al. 2005).

When the colonies presented the following characteristics: resistance to acriflavin (Junco and Barrasa 2002, Davis et al. 2006), coagulse production and ability to fermentate mannitol in anaerobiosis, they were considered *S. aureus* because these tests have been used to confirm phenotypically *S. aureus*, and also to differentiate it from other coagulase positive *Staphylococcus* species (Capurro et al. 1999, Glassmoyer and Russel 2001, Gandra et al. 2005).

### *2.3 Investigation of the ability to produce enterotoxins in an immunoenzymatic assay*

Isolates were submitted to an assay to determine the capacity of producing the enterotoxins A, B, C, D, and E. Thus, the isolates were cultivated in Brain and Heart Infusion broth (BHI) with 1% yeast extract, and incubated for 24 hours. Culture tubes were centrifuged for 15 minutes at 7.500 rpm (Exelsa-2®, 205 N, Fanen). After that, a 500 µL sub sample was withdrawn from the supernatant to detect enterotoxins through the immunoenzymatic assay ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), in the automated system VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2). The assay was performed according to the instructions present in the manual, with few adaptations, since we used bacteria

cultures instead of food samples as suggested by Hennekinne et al. (2007). Reference enterotoxin producing strains A (INCQS 00285; origin ATCC: 13565), B (INCQS 00005; origin: ATCC 14458), C (INCQS 00080; origin: ATCC 19095), D (INCQS 00102; origin: ATCC 23235), and E (INCQS 00093; origin: ATCC 27664), were used as a positive control. These strains were obtained from the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) and from the Fundação Oswaldo Cruz/Brazil (FIOCRUZ).

#### *2.4 Detection of sea, seb, sec-1, sed, and see genes*

For DNA extraction, the cultures were grown in BHI. After 18 hours of incubation, at 37° C, they were centrifuged, the pellet was washed three times in 0.85% saline solution and the DNA was extracted.

DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA Corp., Madison, WI, USA), following instructions of suppliers with slight adaptations. Extraction products were run on 1% agarose gel, and stained with GelRed(R) (Biotium).

Specific primers were used as described previously (Johnson et al. 1991). DNA samples were amplified in a solution with a final volume of 25µL, composed by 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 100µM of dNTP, 0.25 µM of each primer, and 1U of Taq Polimerase thermostable (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen). The amplification was carried out from an initial 2 minute denaturation at 94°C, 29 cycles of denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing at 55°C for 2 minutes, extension for 1 minute at 72°C; and was terminated with a final extension at 72°C for 7 minutes.

Each isolate was amplified with separated pairs of primers. In each reaction, the DNA of the reference enterotoxin producing strains (SEA, SEB, SEC, SED, or SEE),

and *Staphylococcus xylosus* was used as negative controls. A molecular weight marker (Low DNA Mass Ladder Invitrogen T. M) was used to control the size of the amplification products obtained. The amplification products were run in a 1% agarose gel, and stained with GelRed(R) (Biotium).

### 3. Results

From a total of 3.748 analyzed samples, 245 (6.5 %) presented different concentrations of *S. aureus*. The frequency of *S. aureus* in food samples, according to the origin of the samples, was 12.2 % (23/189) from the North region, 7.6 % (27/357) from the Northeast region, 6.1 % (112/1847), from the Southeast region, and 6.1 % (83/1355) from the South region (Table 1).

Concentrations of *S. aureus* in these samples varied from 3.6 CFU/g to  $> 2.9 \times 10^6$  CFU/g. In a total of 172 samples (70.2 %), the numbers varied between 3.6 and 990 CFU/g., while in 33 samples (13.4 %), the total numbers were higher than  $10^5$  CFU /g.

The majority of bacteria isolates (92.2 %) presented a typical growth in agar Baird Parker and 91.8 % produced carotenoid pigments. The majority of strains (85.7%) produced thermonuclease and  $\beta$ -galactosidase (89.8 %). In addition to these characteristics, 94.3 % of the strains fermented maltose in aerobic conditions. All strains fermented mannitol in absence of oxygen, were coagulase positive and resistant to acriflavine. With this combination of biochemical characteristics, we can consider that the isolates were *S. aureus* (Capurro et al. 1999, Glassmoyer and Russel 2001, Gandra et al. 2005).

From a total of 245 isolates of *S. aureus* present in the samples and characterized by biochemical assays, 81 (33.1 %) presented positive results in the automated immunoenzymatic assay (Table 2). In 51 isolates (61.73 %) an amplification of the gene *sea* was observed, 62 (76.54 %) presented an amplification of the gene *seb*, and in 62 (76.54 %) an amplification of the gene *sec-1* was recorded. Only two isolates (2.47 %) and three isolates (3.7 %) presented the genes *sed* and *see*, respectively. In the majority of isolates we observed an amplification of more than one gene that codifies enterotoxins, and the combination presented the highest frequency *sea- seb- sec-1*.

Among the 81 products with enterotoxigenic *S.aureus*, in 70 (86.42%) concentrations were lower than  $10^3$  CFU /g. Three samples of Brazilian cottage-like cheese (queijo de coalho) and one sample of bacon presented enterotoxigenic *S.aureus* in concentrations higher than  $10^5$  CFU /g.

#### **4. Discussion**

Samples in this study presented a low prevalence (6.5%) of isolation of *S. aureus*, probably because the evaluated food items were inspected products and were collected in industries. Therefore, the analyzed products were not exposed to the risk of crossed contamination, which could occur later during food selling and processing. We, thus, observe that studies carried out with food items bought in the market, generally present high prevalence of *S. aureus*. In Brazil, Araújo et al. (2002) evaluated cheese samples sold in Rio de Janeiro state and found *S. aureus* in 20%. Normanno et al. (2007) in a study with samples from milk and meat products in Italy, found that 12.8%

of the samples were *S. aureus* positive, while Simon and Sanjeed (2007), reported a prevalence of 21% of *S. aureus* in fish samples in India.

More than 70.2% of the studied samples presented concentrations of *S. aureus* lower than  $9.9 \times 10^2$ , within the acceptable range (from  $10^2$  to  $10^3$  UFC/g), according to the Brazilian legislation for products of animal origin (Brasil 1996, Brasil 2001). Only 13.4% of the analyzed samples presented concentrations higher than  $10^5$  CFU /g, which is considered a risk for the production of enterotoxins (Akineden et al. 2008).

The percentage of strains (33.1%) that demonstrated capacity of producing classic enterotoxins (A, B, C1, D, and E), in an enriched broth, is compatible with the estimate of Bergdoll (1989), who found that 25% of *S. aureus* strains produce enterotoxins. However, this frequency may vary according to the type of food and to the origin of the sample. Fueyo et al. (2005), in a study conducted with 269 isolates of *S. aureus* from the nose of food handlers, demonstrated that 24.9% produced enterotoxins A, B, C, or D. On the other hand, Simon and Sanjeed (2007), in a study carried out with fish in India, demonstrated that 41% strains isolated from these products were positive for the enterotoxins SEA, SEB, SEC, or SED. In Brazil, Cardoso et al. (1999), in a study carried out with isolates of *S. aureus* from bovine mastitis, found 43.2% of the strains able to produce enterotoxins SEA, SEB, SEC, and SED. On the other hand, Akineden et al. (2008) found 72.8% of the enterotoxigenic strains of *S. aureus* causing bovine mastitis in Germany.

In relation to the 81 strains that produced enterotoxins in culture broth, we observed that 63 (77.8%) came from meat products, 11 (13.6%) were samples of milk products, 3 (3.7%) were from fish, and 4 (4.9%) were from other products of animal origin. Among the meat products, the chicken meat and the chicken Mechanically Separated Meat (MSM) presented the highest frequency of isolation of *S. aureus* and



also the highest number of enterotoxigenic strains. However, in all samples of these products the numbers of enterotoxigenic *S.aureus* were not higher than the acceptable limit of  $10^3$ , even though the MSM is a type of food that goes through an intense mechanical processing for grinding and removal of bones. Among meat products, only one bacon sample presented isolation of enterotoxigenic *S.aureus* in a high concentration ( $>10^6$ ). This product is processed in Brazil with smoked pork meat and usually is consumed fried or cooked. Twenty-one samples of this food item were analyzed during the study period and only one sample from the North Region of Brazil, where production of pork meat is not a main activity, was positive for *S. aureus*. This probably was an isolate requirement for the investigation of the official inspection system.

Among milk products, the highest index of isolation of *S. aureus* were found in mozzarella cheese and in Brazilian cottage-like cheese, however, in the majority of strains it was not possible to detect the capacity of producing the studied enterotoxins. On the other hand, all samples of Brazilian cottage-like cheese that presented enterotoxigenic strains of *S.aureus* had population numbers higher than  $10^5$  UFC/g. These cheeses, produced mainly in the North and Northeastern regions, are made out of pasteurized milk, go through a process of coagulation and addition of salt (NaCl 1%), without maturation, acquiring a slightly acid flavor. After that, this type of cheese is fractionated, sold in wooden sticks, and quickly cooked over coal before being consumed.

The production of staphylococcal toxins is influenced by several factors (Le Loir et al. 2003). First, a population number of *S. aureus* higher than  $10^5$ , in the food, is considered a pre-requisite for the production of toxin. However, other factors such as the pH of the food, the concentration of NaCl and the presence of microorganisms that

compete with *S. aureus* could directly affect the production of toxins by enterotoxigenic strains (Bergdoll 1989, Le Loir et al. 2003). Food items that present enterotoxigenic strains in a concentration higher than  $10^5$  were found in the present study, especially the Brazilian cottage-like cheese. This cheese presented low acidity and low concentration of salt characteristics considered favorable to the production of SEs, indicating that there was a risk for the presence of these toxins in the products. Since these enterotoxins are thermostable (Bergdoll 1983), the posterior heat, especially in the case of the Brazilian cottage-like cheese, does not assure the destruction of the toxin. In addition, this product is frequently exposed to inadequate storage conditions, being sold by street vendors, which could lead to an increase of *S. aureus* populations and the production of toxins, imposing a high risk to the consumer.

Several methods have been developed to detect enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* sp. and enterotoxins in food items, among them, the Polymerase Chain Reaction (McLauchlin et al. 2000, Kérouanton et al. 2007, Akineden et al. 2008), and the detection of toxin by an immunoenzymatic assay (Hennekinne et al. 2007, Jechorek and Johnson 2008). In the present study, we used the VIDAS® SET2 kit developed to detect the enterotoxin in the food, but also used to identify enterotoxins (from A-E) in the bacterial culture broth (Morandi et al. 2007), and obtained good results. All strains with a positive result in the enterotoxin detection test were submitted to the PCR and presented an amplification of at least one of the targeted genes (*sea*, *seb*, *sec-1*, *sed*, and *see*) and a high prevalence of the genes *seb* and *sec-1*. Other studies have demonstrated the relatively high frequency of *sec* in products of animal origin (Akineden et al. 2008), however, SEA is generally the most frequent toxin produced by strains of *S. aureus* (Fueyo et al. 2005, Normanno et al. 2005). Also in isolates sampled during outbreaks, the gene *sea* has been reported as the most frequent (Chiang et al. 2008). In Brazil, there

are few data about the prevalence of the SE genes in food samples. However, Veras et al. (2008), found among 30 strains of *Staphylococcus* coagulase positive and negative isolated from milk products from food poisoning outbreaks occurred in Minas Gerais state, 11 strains that amplified only the gene *sea*, 8 strains that amplified only *seb*, and 7 strains with *sea* and *seb*. Rall et al. (2008) studied strains of *S. aureus* isolated from fluid milk and found *sea*, followed by *sec*, as the most frequent enterotoxigenic strains.

In relation to the genetic profile presented by the strains, we observed that only 22 strains (27.16%) presented only one of the genes, while 72.84% had multiple genes. The most frequent profile was found in 40.74 % of the strains, and was composed by *sea*, *seb*, and *sec* genes. The presence of multiple genes has also been reported in other studies (Fueyo et al. 2005, Morandi et al. 2007, Rall et al. 2008). It is possible that the strains studied in this work present other genes that codify SEs, since here we only focused on the main enterotoxins causing food poisoning (SEA-SEE). However, other genes such as *seg*, *seh*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr*, *selu*, and *selv* are also in the SEs groups. These genes were isolated from patients with several types of infections (Jarraud et al. 2001, Mempel et al. 2003), and the denomination “staphylococcal enterotoxin-like superantigen” was proposed. Even though they have similarities with the nucleotide sequence of classical SEs, they usually do not demonstrate emetic capacity (Blaiotta et al. 2006). Some of these SEs, such as SEIH, SEII, and SEIG have demonstrated an emetic activity similar to the classic SEs (Chen et al. 2004, Blaiotta et al. 2004, Jorgensen et al. 2005, Ikeda et al. 2005, Bania et al. 2006, Blaiotta et al. 2006, Akineden et al. 2008), but only 5 % of the food poisonings caused by *S. aureus* could be related to them (Bania et al. 2006).

Considering the total number of analyzed samples (n=3.748), we observed that only 2.2 % (n=81) presented *S. aureus* producing classical enterotoxins. From these

total, 68 were present in food items in a concentration lower than  $9.9 \times 10^2$  CFU/g, and only 4 (0.1 %) presented concentrations higher than  $1.0 \times 10^5$  CFU /g, becoming a risk for the presence of the toxin. From these results, it is possible to conclude that the risk of having pre-formed enterotoxins in animal derived food items that go through an industrial process controlled by the Brazilian Official Inspection Service is very low.

### **Aknowledgements**

We thank the representatives of the Laboratórios de Microbiologia do LANAGRO/PE, LANAGRO /PA, and LANAGRO/SP, for sending the isolated strains and for their general collaboration; the Coordenação Geral de Apoio Laboratorial/DF (CGAL); the Divisão Técnica Laboratorial, the Setor de Apoio Operacional, and the Coordenação do LANAGRO/RS, for their support. We also thank the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/BR) for the reference strains, and the Biomerieux do Brasil, for sending the material used in the imunoenzimatic assays.

### **References**

Akineden, Ö., Abdulwahed, A.H., Schneider, E., Usleber, E., 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats milk cheese. International Journal of Food Microbiology 124, 211-216.

Araújo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L.P., Freitas-Aleida, A.C., 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1172-1177.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61, 1-10.

Bania, J., Dabrowska, A., Jaroslaw, B., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J., 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *International Journal of Food Microbiology* 108, 36-41.

Bennett, R.W.; Lancette, G.A., 2001. *Staphylococcus aureus*. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*. (<http://www.cfsan.fda.gov>). Access in December 2008.

Bergdoll, M. S., 1983. Enterotoxins. In: Adlam, C. and Easmon, C. S. F (Eds.), *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Academic Press Inc., London, vol. 2, pp. 559-598.

Bergdoll, M. S., 1989. *Staphylococcus aureus* In: Doyle, M. P. (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 463-523.

Betley, M. J., Mekalanos, J. J., 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* 170, 34-41.

Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology* 94, 719-730.

Blaiotta, G., Fusco, V., von Eiff, C., Villani, F., Becker, K., 2006. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9), 6117-6123.

Borst, D. W., Betley, M. J., 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infection and Immunity* 62, 113-118.

Brasil, 1950. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950 - Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 19 de dez., 1950. Seção I, 18.161.

Brasil, 1952. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 07 de jul., 1952. Seção I, 10.785.

Brasil, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146 de 07 de março de 1996 – Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de mar., 1996. Seção I, 3977.

Brasil, 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de jan., 2001. Seção I, 45-53.

Brasil, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de set., 2003. Seção I, 14-50.

Capurro, A., Concha, C., Nilsson, L. Östensson, K. 1999. Identification of

coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica* 40, 315-321.

Cardoso, H.F.T., Silva, N., Sena, M. J., Carmo, L. S., 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 29, 347-349.

Chen, T.R., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 92, 189-197.

Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S, Tsen, H.Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 121, 66-73.

Davis, J.A., Farrah, S.R., Wilkie, A.C., 2006. Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. *Letters in Applied Microbiology* 42(6), 606-611.

Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smith, C.J., 2001. Characterization of putative pathogenicity islands from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology* 183, 63-70.

Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Martín, M.C., 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes and Infection* 7, 187-194.

Gandra, E.A., Silva, J.A., Macedo, M.R.P., Araújo, M.R., Mata, M.M., Silva, W.P., 2005. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. *Archives of Veterinary Science* 10 (1), 75-81.

Glassmoyer K.E., Russel, S.M., 2001. Evaluation of a selective broth for detection of *Staphylococcus aureus* using impedance microbiology. *Journal of Food Protection* 64(1), 44-50.

Hennekinne, J.A., Guillier, F., Perelle, S., DeBuyser, M.L., Dragacci, S., Krys, S., Lombard, B., 2007. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16.140 standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology* 102(5), 1261-1272.

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S., 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2793-2795.

Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G., 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*. 166, 669-677.

Jechorek R.P., Johnson R.L., 2008. Evaluation of the VIDAS staph enterotoxin II (SET 2) immunoassay method for the detection of staphylococcal enterotoxins in selected foods: collaborative study. *Journal of AOAC International* 91(1), 164-173.

Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rozee, K.R., 1991. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock



Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29(3), 426-430.

Jorgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters* 252, 267-272.

Junco, M.T.T. and Barrasa, J.T.M., 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine* 49, 419-423.

K rouaton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115, 369-375.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2 (1), 63-76.

McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* 63, 479-488.

Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H.P., Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F., 2003. High prevalence of superantigens associated with the ecg locus in *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic eczema. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22, 306-309.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioli, B., 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* 124, 66-72.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V., 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.

Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G. V., 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290-296.

Rall, V.L.M., Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes Jr., A., Candeias, J.M.G., Cardoso, K.F.G, Araújo Jr., J.P., 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology* 132, 408-413.

Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Besser, T.E., 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3217-3219.

Schafer, W.M., Iandolo, J.J., 1978. Chromosomal locus for *Staphylococcus* enterotoxin B. *Infection and Immunity* 20, 273-278.

Simon, S.S., Sanjeev, S., 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control* 18, 1565-1568.

Shalita, Z., Hertman, I., Sand, S., 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 129, 317-325.

Van Amson, G., Haracemiv, S.M.C., Masson, M.L., 2006. Levantamento de dados epidemiológicos relativos às ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 30, 1139-1145.

Veras, J.F., Carmo, L.S., Lawrence, C.T., Jeffrey, W.S., Cummings, C., Santos, D.A., Cerqueira, M.M.O.P., Cantini, A., Nicoli, J.R., Jett, M., 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brasil. *International Journal of Infectious Diseases* 12, 410-415.

Table 1: Animal derived products analyzed. The number of samples with isolation of *S. aureus* is shown in parenthesis.

Product	Southeast	South	North	Northeast	Total
<b>Milk products</b>					
Brazilian cottage-like cheese (queijo de coalho)	-	-	7(6)	27(23)	34(29)
Fresh/soft cheeses	275(12)	126(5)	96(14)	34	531(31)
Semi-hard cheeses	19(1)	8	3	8	38(1)
Hard cheeses	4	40	-	-	44
Grated cheeses	24(3)	10	1	-	35(3)
Processed cheeses	50(1)	7	-	2	59(1)
Milk dessert	14(1)	-	-	-	14(1)
Powder Milk	61(1)	102	7(1)	64	234(2)
Others	192	75	18	27	312
Sub-total	639(19)	368(5)	132(21)	162(23)	1301(68)
<b>Meat products</b>					
Fresh, refrigerated and frozen meat and offal	150(29)	3(1)	9	26	188(30)
Processed meat and offal	232(12)	47(4)	5(1)	8	292(17)
Refrigerated and frozen chicken (whole/cuts/ offal)	195(18)	198(23)	-	36(3)	429(44)
Processed chicken cuts	16(1)	9	-	-	25(1)
Refrigerated rabbit	3	-	-	-	3
Chicken MSM	14(7)	111(29)	-	-	125(36)
Pork MSM	-	4	-	-	4
Raw Sausage/Salame	174(14)	273(17)	7	10(1)	464(32)
Hamburger/Meat Ball	19(3)	12(1)	-	4	35(4)
Sausage	24	76(3)	-	1	101(3)
Others	141	200	2	8	351
Sub-total	968(84)	933(78)	23(1)	93(4)	2017(167)
<b>Fish</b>					
Eviscerated fish/fish fillet/products with fish	81(3)	46	26	44	197(4)
Crustaceans	1	8	6	58	73
Sub-total	82(3)	54	32(1)	102	270(4)
<b>Miscellaneous</b>					
Eggs <i>in natura</i>	31	-	-	-	31
Egg derived foods or processed egg derived food	70(2)	-	-	-	70(2)
Honey and honey derived food	3	-	-	-	3
Pizza	11(4)	-	-	-	11(4)
Others	43	-	2	-	45
Sub-total	158 (6)	-	2	-	160 (6)
<b>TOTAL</b>	<b>1847(112)</b>	<b>1355(83)</b>	<b>189(23)</b>	<b>357(27)</b>	<b>3748(245)</b>

Table 2. Quantification of enterotoxigenic *S.aureus* and profiles of gene amplification of the enterotoxins A, B, C, D, and E.

Food item	Samples with enterotoxigenic <i>S.aureus</i>	Profile of enterotoxins (number of samples)	Quantification of <i>S.aureus</i> (ufc.g <sup>-1</sup> ) (number of samples)
Chicken MSM	11	<i>sea/seb/sec</i> (3), <i>seb/sec</i> (3), <i>sec</i> (2), <i>sea/seb</i> (1), <i>sea</i> (1), <i>seb</i> (1)	10 <sup>2</sup> (10), 10 <sup>3</sup> (1)
Chicken carcace	8	<i>sea/seb/sec</i> (2), <i>seb/sec</i> (2), <i>sea/seb/sec/sed</i> (1), <i>sea/sec</i> (1), <i>sec</i> (1), <i>sea</i> (1)	10 <sup>2</sup> (6), 10 <sup>3</sup> (2)
Chicken cuts	6	<i>sea/seb/sec</i> (2), <i>seb/sec</i> (2), <i>sea/sec</i> (1), <i>sec</i> (1)	10 <sup>2</sup> (5), 10 <sup>3</sup> (1)
Beef	6	<i>sea/seb/sec</i> (3), <i>sea/sec</i> (2), <i>seb/sec/see</i> (1)	<10 <sup>1</sup> (4), 10 <sup>1</sup> (2)
Raw pork sausage	6	<i>sea/seb/sec</i> (3), <i>sea/seb/sec/see</i> (1), <i>sed</i> (1), <i>seb</i> (1)	10 <sup>2</sup> (5), 10 <sup>4</sup> (1)
Hamburger	4	<i>sea/seb/sec</i> (3), <i>sea/seb</i> (1)	10 <sup>2</sup> (4)
Jerked beef	4	<i>sea/seb/sec</i> (2), <i>seb/sec</i> (2)	<10 <sup>1</sup> (3), 10 <sup>1</sup> (1)
Ground beef	3	<i>sea/seb/sec</i> (2), <i>seb</i> (1)	10 <sup>2</sup> (3)
Brazilian cottage-like cheese	3	<i>seb</i> (2), <i>sea/sec</i> (1)	>10 <sup>5</sup> (3)
Mozarella cheese	3	<i>sea/seb/sec</i> (3)	10 <sup>2</sup> (2), 10 <sup>4</sup> (1)
Cooked beef sausage	2	<i>seb</i> (1), <i>sec</i> (1)	10 <sup>1</sup> (2)
Egg yolk	2	<i>sea/seb/sec</i> (1), <i>seb/sec</i> (1)	<10 <sup>1</sup> (2)
Bacon	1	<i>sea/seb/sec</i>	>10 <sup>6</sup>
Grated cheese	1	<i>sea/seb</i>	10 <sup>4</sup>
Others	21	<i>sea/seb/sec</i> (8), <i>seb</i> (4), <i>sea/sec</i> (2), <i>sec</i> (2), <i>sea</i> (2), <i>sea/seb</i> (1), <i>seb/sec</i> (1), <i>seb/sec/see</i> (1)	<10 <sup>1</sup> (10), 10 <sup>1</sup> (2), 10 <sup>2</sup> (8), 10 <sup>3</sup> (1)

**CAPÍTULO 3: ARTIGO 2: Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil**

ACEITO: ACTA SCIENTIAE VETRINARIAE, 2009.

**Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil**

**Resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal derived foods analyzed by the Brazilian Federal Inspection Service**

Beatris Sonntag Kuchenbecker<sup>1,2</sup>, Aldemir Reginato Ribeiro<sup>2</sup>, Marisa Cardoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

CORRESPONDÊNCIA:

B.S.

Kuchenbecker

[beatris.kuchenbecker@agricultura.gov.br].

## RESUMO

A preocupação com a presença de isolados bacterianos resistentes a antimicrobianos em alimentos tem sido crescente, levando ao lançamento de programas de monitoramento de emergência de resistência em vários países. A partir disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal amostrados pelo Sistema de Inspeção Federal nos anos de 2003 e 2004. Foram avaliados 245 isolados pela técnica de disco-difusão conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Oitenta e oito isolados (35,9%) não evidenciaram resistência aos antimicrobianos testados. Os maiores índices de resistências foram à penicilina (30,2%), norfloxacina (19,6%) e canamicina (17,1%). Foram identificados 64 perfis diferentes de resistências, sendo os mais frequentes a resistência à penicilina e penicilina/canamicina. Os perfis de resistência que incluíam quinolonas foram encontrados, principalmente, em produtos derivados de carne de frango. De forma geral, os índices de resistência observados nos isolados analisados estiveram abaixo dos relatados para isolados obtidos de amostras clínicas de humanos, onde isolados de *S.aureus* multi-resistentes constituem um importante obstáculo ao sucesso do tratamento. Entretanto, a presença de alguns perfis de resistência, incluindo betalactâmicos ou quinolonas, indica a necessidade de investigação e monitoramento em isolados de animais e alimentos.

**Descritores:** alimentos, *Staphylococcus aureus*, resistência a antimicrobianos.



## ABSTRACT

The concern about the isolation of antimicrobial resistant bacteria from food has increased in the last years, leading to the launch, in many countries, of programs to monitor resistance emergence. In this connection, the aim of this study was to evaluate the resistance profile in *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal derived foods, sampled by the Brazilian Federal Inspection Service in 2003 and 2004. Two hundred and forty five strains were evaluated by the disk susceptibility test following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Eighty eight strains (35.9%) were susceptible to all tested antimicrobials. The highest resistance frequency was observed against penicillin (30.2%), norfloxacin (19.6%) and kanamycin (17.1%). Sixty four different resistance profiles could be identified, and the profiles resistance to penicillin, or to penicillin/kanamycin were the most prevalent. Resistance profiles including quinolones were identified mostly in poultry derived products. In general, the resistance frequency found in our strains was lower than the frequencies reported in *S.aureus* strains from human clinical cases, which are commonly multiresistant and constitute an obstacle to the successful treatment of staphylococcal infections. However, the identification of resistance profiles including betalactam and quinolone points to the need of further monitoring of animal and human isolates.

**Key words:** food, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial resistance.

## INTRODUÇÃO

O sucesso da penicilina no tratamento de infecções estafilocócicas seguido, em curto espaço de tempo, pela emergência e disseminação de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes em hospitais e na comunidade, levou à busca de novas moléculas, naturais ou sintéticas, que pudessem ser utilizadas na terapêutica. Contudo, observa-se que a introdução de novos antimicrobianos no tratamento tem sido acompanhada invariavelmente pela seleção de cepas resistentes, decorrente da aquisição de genes de resistência (1, 5, 17,18).

A origem dos genes de resistência ainda é controversa, porém microrganismos ambientais são apontados como sua provável fonte primária (1). A disseminação desses genes entre microrganismos comensais e patogênicos foi acelerada durante a era dos antibióticos, garantindo o surgimento de clones multi-resistentes. Mais recentemente, a transmissão de isolados resistentes pelo consumo de produtos de origem animal tem sido documentada, levando diversos países a propor programas de monitoramento de isolados resistentes em alimentos (4, 26).

No Brasil, os produtos de origem animal processados em indústrias sob Inspeção Federal são amostrados e analisados pela rede de laboratórios oficiais, seguindo a legislação vigente (6, 8). A enumeração de *S. aureus* é uma das técnicas mais frequentemente realizadas, propiciando a formação de uma coleção abrangente de isolados, que pode ser utilizada para o monitoramento da emergência de multi-resistência. A partir disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os índices de resistências a antimicrobianos e determinar os perfis de resistência mais frequentes em isolados de *S.aureus* obtidos a partir de produtos de origem animal analisados nos anos de 2003 e 2004.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras bacterianas

O estudo foi conduzido em 245 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 3.748 amostras de alimentos de origem animal, analisados nos anos de 2003 e 2004 pelos laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA). Dos 245 isolados, 83 foram provenientes da Região Sul, 112 do Sudeste, 23 do Norte e 27 do Nordeste. Os alimentos de origem dos isolados foram queijo (n=65), frango (n=78), linguiça (n=29), outros tipos de carnes (n=60) e outros alimentos com menor representatividade (n=13).

Todos os produtos foram remetidos aos laboratórios oficiais, após serem colhidos nas indústrias por um representante legal do Serviço de Inspeção Federal, e transportados em condições que davam garantias da inviolabilidade das embalagens e da manutenção da temperatura e demais condições indicadas para cada produto. Na chegada ao laboratório, todos os dados relativos às amostras eram conferidos, garantindo que nenhuma situação que pudesse trazer dúvida sobre as condições necessárias para a realização do ensaio fosse possível. As análises iniciavam em até 24 horas após a chegada da amostra do alimento ao laboratório. Cada amostra de alimento foi submetida a protocolo de quantificação de Unidades Formadoras de Colônia ou estimativa de Número Mais Provável de *S. aureus*, segundo os “Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água” do MAPA, contidos na Instrução Normativa nº 62/2003 (7).

Colônias suspeitas em ágar Baird Parker foram confirmadas de acordo com características definidas na metodologia oficial do MAPA, ou seja, crescimento típico ou atípico em ágar Baird Parker, coloração de Gram, produção de catalase, coagulase e produção de termonuclease. Colônias confirmadas foram submetidas à caracterização

bioquímica suplementar: capacidade de crescimento em Agar Baird Parker suplementado com 7 µg/mL de acriflavina, produção de beta-galactosidase em caldo ONPG – Ortho-Nitrophenyl-beta-galactoside, capacidade de produção de pigmentos carotenóides em Agar PCA<sup>1</sup> (Plate Count Ágar) e capacidade de metabolizar maltose em aerobiose e manitol em anaerobiose (9, 14, 24). Quando apresentavam as seguintes características: resistência à acriflavina, positividade na prova de coagulase e capacidade de fermentar manitol em anaerobiose, formando ácido, os isolados foram considerados *S. aureus* (9, 13, 14, 25). Isolados confirmados foram estocados em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) acrescido de 20% de glicerol a -20°C.

#### **Testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão**

Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos, seguindo a norma M2-A8 do CLSI (11). Para tanto, os isolados foram semeados em caldo BHI e, após incubação de 24 horas, isolados em Agar PCA. Para realização do teste, foi utilizado Ágar Mueller-Hinton<sup>2</sup>, sendo que o inóculo era uma suspensão direta de colônias equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland, originárias da placa de Agar PCA, após 24 horas de incubação. Os discos<sup>3</sup> impregnados com concentrações especificadas dos antimicrobianos foram: Penicilina (10 U), Cefoxitina (30 µg), Teicoplanina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Canamicina (30 µg), Eritromicina (15 µg), Telitromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg), Doxiciclina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Norfloxacina (10 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Clindamicina (2 µg), Sulfametoxazol-Trimetoprima (23,75 e 1,25 µg), Cloranfenicol (30 µg), Rifampicina (5 µg), Linezolida (30 µg). Como controle de qualidade dos discos de antimicrobianos, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923, conforme recomendação. A leitura dos testes foi realizada após incubação à 34°C por 16-18 horas.

## RESULTADOS

Do total de isolados de *S.aureus*, 88 (35,9%) não apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, enquanto os demais 157 (64,1%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Todos os isolados foram sensíveis à gentamicina. As maiores freqüências de resistência foram observadas contra penicilina, norfloxacina, canamicina e tetraciclina (Tabela 1). Os produtos de frango apresentaram um índice mais elevado (82,9%) de isolados com resistência a pelo menos um antimicrobiano, enquanto os isolados obtidos de queijo foram os que apresentaram perfil de total sensibilidade mais freqüentemente (53,9%).

Considerando as regiões de origem dos isolados, a freqüência de resistência foi mais elevada nas regiões Sudeste (67,9%) e Sul (70%), enquanto os isolados provenientes do Nordeste (59,2%) e Norte (30,4%) foram menos resistentes frente aos antimicrobianos testados.

Foram encontrados 64 perfis de resistência distintos, sendo os mais prevalentes a resistência apenas contra Penicilina (n=23) e o perfil Penicilina/Canamicina (n=17). Esses perfis foram detectados predominantemente em isolados provenientes de lingüiça, queijo e carne bovina. Os perfis que incluíram antimicrobianos do grupo das quinolonas (norfloxacina e ciprofloxacina) predominaram em produtos relacionados à carne de frango (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

A preocupação quanto à resistência de microrganismos aos antimicrobianos tem sido crescente em todos os países. O uso desnecessário de antimicrobianos, a falta de diagnóstico etiológico e de perfil de resistência de patógenos, o uso de agentes antimicrobianos de amplo espectro, a pressão da indústria farmacêutica para o consumo

indiscriminado de antimicrobianos e o uso destes como promotores de crescimento em animais têm sido apontados como fatores que contribuíram para o desenvolvimento de resistência em bactérias (27). Somado a isto, o deslocamento de humanos, animais e produtos, no âmbito nacional e internacional, teria colaborado para a disseminação de isolados resistentes (17). Em relação aos alimentos, esse fato tem resultado na crescente preocupação da comunidade internacional quanto ao uso de antimicrobianos na produção animal e na organização de programas de monitoramento de resistência em patógenos veiculados por alimentos (1).

No presente estudo, a análise de isolados de *S.aureus*, obtidos de diferentes grupos de produtos de origem animal provenientes de indústrias localizadas em quatro regiões geográficas distintas do país, propiciou uma primeira tentativa de monitoramento do perfil de resistência a antimicrobianos usados para o tratamento de infecções estafilocócicas em humanos. Como esperado, a maioria dos isolados (64,1%) apresentou resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, concordando com a observação que a presença de genes de resistência em *S.aureus* não é mais um fenômeno restrito ao ambiente hospitalar (3, 10, 17, 20). O maior índice de resistência observado foi contra penicilina (30,2%), o que também está de acordo com outros estudos realizados com isolados obtidos de alimentos (12, 15, 16, 19, 22). Entretanto, observa-se que as frequências de isolados resistentes relatadas nesses estudos é superior (57,6 até 100%) ao encontrado no grupo de isolados aqui analisados, podendo significar que houve menor pressão de seleção para resistência na região e época analisadas. A resistência apenas à penicilina foi o perfil comum apresentado pelo maior número de isolados (n=23), não sendo observada a concentração desse perfil em grupo de isolados obtidos a partir de um alimento específico.

O maior número de isolados resistentes em produtos originados das regiões Sul e Sudeste, verificado no presente estudo, foi possivelmente relacionado à concentração, nessas regiões, da produção animal intensiva, que costuma levar ao uso mais freqüente de antimicrobianos de forma profilática e metafilática, aumentando a pressão de seleção de isolados resistentes. O mesmo motivo pode justificar o maior número de isolados resistentes originados de produtos de carne de frango.

A tendência de origem comum não pode ser observada para os perfis de resistência mais prevalentes (Penicilina e Penicilina/canamicina), mas foi evidente em relação às quinolonas testadas no presente estudo (norfloxacina e ciprofloxacina), cujos isolados resistentes foram preponderantemente originados de produtos derivados de carne de frango. Entre os 48 isolados resistentes à norfloxacina, apenas quatro não eram originados desse tipo de produto, indicando uma possível associação. Em 15 isolados, apenas a resistência às quinolonas foi observada, não representando isolados multi-resistentes, mas indicando a seleção possivelmente resultante do uso de alguma quinolona na criação animal. A elevada prevalência de isolados resistentes às quinolonas em frangos foi relatada anteriormente, onde 30% dos isolados de *S.aureus* de infecções foram resistentes à ciprofloxacina na Dinamarca (2). No Brasil, a resistência às quinolonas em outras bactérias isoladas de aves também foi descrita, principalmente em isolados obtidos antes do início do controle rigoroso do uso de antimicrobianos na avicultura (21, 23).

De forma geral, os índices de resistência apresentados pelos isolados de *S.aureus* provenientes de alimentos não estiveram em níveis superiores aos relatados na literatura, e bem abaixo dos isolados desse microrganismo obtidos de humanos. Entretanto, alguns perfis de resistência com características peculiares, que podem ter sido resultado da introdução de isolados a partir de manipuladores, ou podem ter sido

originados da seleção pelo tratamento de animais com esses antimicrobianos, precisam ser mais bem caracterizados.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados demonstram a possibilidade da veiculação, através dos alimentos, de cepas de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas em humanos, demonstrando a necessidade de estudos epidemiológicos a respeito da distribuição destes isolados em populações humanas e animais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos aos Laboratórios de Microbiologia do Lanagro/RS, Lanagro/PE, Lanagro/PA e Lanagro/SP, pela imensa colaboração e pela cedência das cepas isoladas em seus laboratórios; à Coordenação Geral de Apoio Laboratorial/DF (CGAL); à Divisão Técnica Laboratorial, Setor de Apoio Laboratorial e à Coordenação do Lanagro/RS, pelo apoio.

## **NOTAS INFORMATIVAS**

1 Merck, Darmstadt, Alemanha

2 Fluka, Busch, Suíça

3 BioRad, Hercules, USA

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- 1 Aarestrup F..M. 2006.** The Origin, Evolution and Local and Global Dissemination of Antimicrobial Resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.). *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington DC: ASM Press, pp. 339-359.
- 2 Aarestrup F.M., Agerso Y., Christensen J.C.O., Madsen M. & Jensen, L.B. 2000.** Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Veterinary Microbiology*. 74: 353-364.
- 3 Aarestrup F.M. & Schwarz S. 2006.** Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. In: Aarestrup F.M. (Ed.). *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington DC: ASM Press, pp. 187- 212.
- 4 Bager F., Madsen M., Christensen J. & Aarestrup F.M. 1997.** Avoparcin used as growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 31: 92-112.
- 5 Biedenbach D.J., Bell J.M., Sader H.S., Fritsche T.R., Jones R.N. & Turnidge J.D. 2007.** Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30: 143-149.
- 6 Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1996.** Portaria 146 de 07 de março de 1996 – Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de mar., 1996. Seção I, 3977.
- 7 Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003.** Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003 - Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set., 2003. Seção I, 14-50.

**8 Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001.** Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de jan., 2001. Seção I, 45-53.

**9 Capurro A., Concha C., Nilsson L. & Östensson K. 1999.** Identification of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Acta Veterinariae Scandinava*. 40: 315-321.

**10 Chambers H. F. 2001.** The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*.7: 178-182.

**11 Clinical Laboratory Standards Institute. 2003.** Document M2-A8 - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard – Eight Edition. v. 23, n. 1.

**12 Dantas M.C., André P.B., Santos P.P., Campos M.R.H., Borges L.J. & Serafini A.B. 2006.** Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas frescal em laticínio de Goiás, Brasil. *Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 43: 102-108.

**13 Davis J.A., Farrah S.R. & Wilkie A.C. 2006.** Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 606-611.

**14 Gandra E.A., Silva J.A., Macedo M.R.P., Araújo M.R., Mata M.M. & Silva, W.P., 2005.** Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*

isolated from bovines with subclinical mastitis. *Archives of Veterinary Science*. 10: 75-81.

**15 Kérouaton A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A. & De Buyser M.L., 2007.** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 369-375.

**16 Loeto D., Matscheka M.I. & Gashe B.A 2007.** Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. *Journal of Food Protection*. 70: 2764-2768.

**17 Lowy F.D. 2003.** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111: 1265-1273.

**18 Martineau F., Picard F.J., Lansac N., Ménard C., Roy P. H., Ouellette M. & Bergeron M. G. 2000.** Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(2): 231-238.

**19 Nitzsche S., Zweifel C. & Stephan R. 2007.** Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. *Veterinary Microbiology*. 120: 292-299.

**20 Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E. & Celano G.V. 2007.** Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 290-296.

- 21 Oliveira S.D., Flores F.S., dos Santos L.R. & Brandelli, A. 2005** Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*. 97: 297-305.
- 22 Rapini L.S., Teixeira J.P., Martins N.E., Cerqueira M.M.O.P., Souza M. R. & Penna, C.F.A.M., 2004.** Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56: 130-133.
- 23 Ribeiro A.R., Kellermann A., Santos L.R. & Nascimento V.P. 2008.** Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60: 1259-1262.
- 24 Roberson J. R., Fox L. K., Hancock D. D. & Besser, T. E. 1992.** Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 3217-3219.
- 25 Tejedor Junco M.T. & Martín Barrasa J.L. 2002.** Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive Staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis extern. *Journal Veterinary Medicine B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 49: 419-423.
- 26 Varma J.K., Molbak K., Barret T.J., Beebe J.L., Jones T.F., Rabatsky H.T., Smith E., Vugia D.J., Chang H.G. & Angulo F.J. 2005.** Antimicrobial-resistant non-typhoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *Journal Infectious Diseases*. 191: 554-561.
- 27 Wise R., Hart T., Cars O., Streulens M., Helmuth R., Huovinen P. & Sprenger M., 1998.** Antimicrobial resistance. *British Medical Journal*. 317: 609-610.

Tabela 1 – Frequência de isolados resistentes a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados na rede oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em 2003 e 2004, de acordo com a região de origem dos produtos.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Sul (n=83)</b>	<b>Sudeste (n=112)</b>	<b>Norte (n=23)</b>	<b>Nordeste (n=27)</b>	<b>Total (n=245)</b>
Canamicina	16	24	1	1	42 (17,1%)
Cefoxitina	3	2	0	0	5 (2,0%)
Ciprofloxacina	16	12	0	1	29 (11,8%)
Clindamicina	4	8	1	1	14 (5,7%)
Cloranfenicol	0	1	1	1	3 (1,2%)
Doxiciclina	14	18	1	6	39 (15,9%)
Eritromicina	10	10	3	3	26 (10,6%)
Linezolida	2	16	1	0	19 * (7,7%)
Nitrofuantoína	1	3	0	0	4 (1,6%)
Norfloxacina	30	15	0	3	48 (19,6%)
Penicilina	28	42	3	6	74 (30,2%)
Rifampicina	3	5	2	0	10 (4,1%)
Sulfametoxazol/trimetoprima	4	15	3	6	28 (11,4%)
Teicoplanina	2	12	1	0	15 (6,1%)
Telitromicina	5	8	1	0	14 (5,7%)
Tetraciclina	14	19	1	7	41 (16,7%)

\*Isolados classificados como “não sensíveis” de acordo com a recomendação do CLSI (2003).

Tabela 2: Perfis de resistência mais prevalentes em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de produtos de origem animal analisados na rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em 2003- 2004.

<b>Perfil de resistência</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Alimento de origem (número de amostras)</b>
Penicilina	23	Lingüiça (6), Queijo (5), Carne bovina (3), Carcaças frango (2), Envoltório (1), Jerked beef (1), CMS ave (1), Peixe elaborado (2), Leite em pó (1), Corte salgado suíno (1)
Penicilina/Canamicina	17	Lingüiça (6), Carne bovina (3), CMS ave (2), Carne eqüina (1), Pato (1), Jerked beef (1), Hambúrguer (1), Queijo (1), Carcaça frango (1)
Penicilina/Clindamicina/Linezolida/ Ertitromicina/Rifampicina/ Teicoplanina/ Telitromicina	3	Queijo (3)
Norfloxacina	13	CMS ave (7), Carcaça frango (2), Lingüiça (2), Corte frango (1), Queijo (1)
Norfloxacina/Ciprofloxacina	5	Carcaça frango (2), Cortes frango (2), CMS ave (1)
Norfloxacina/Ciprofloxacina/ Tetraciclina/ Doxiciclina	6	CMS ave (3), Carcaça frango (2), Corte frango (1)
Norfloxacina/Tetraciclina/ Doxiciclina	4	CMS ave (3), Corte de frango (1)
Tetraciclina/Doxaciclina	6	Carcaça frango (3), CMS ave (1), Gema pasteurizada (1), Queijo (1)
Sulfametoxazol/Trimetoprima	11	Queijo (7), Carcaça frango (1), Envoltório (1)

## **CAPÍTULO 4: Discussão Geral**

## DISCUSSÃO GERAL

O monitoramento da qualidade higiênico-sanitária dos produtos de origem animal passa, indiscutivelmente, pelo controle através das análises microbiológicas. Não se questiona a necessidade de haver um controle preventivo da presença e quantidade de *S. aureus* e outros patógenos em alimentos; e, sem dúvida nenhuma, as técnicas microbiológicas tradicionais de pesquisa e enumeração são uma forma importante de monitoramento da população deste e de outros microrganismos em produtos de origem animal. Mas estas técnicas podem e devem ser complementadas, pois somente estas não garantem o monitoramento da qualidade e da inocuidade dos alimentos. Há necessidade de aprofundamento, estudo e análise complementar acerca das características dos isolados nacionais, especialmente daquelas relacionadas à patogenia e formas de transmissão e distribuição destes microrganismos. Isto é especialmente importante quando se tratam de cepas de coleção, pertencentes a laboratórios de referência, cepas relacionadas a surtos, ou, ainda, cepas que são isoladas de determinados alimentos em determinadas regiões e que representam um grupo, enriquecendo e subsidiando estudos epidemiológicos e avaliações de risco.

Apesar dos sintomas da enfermidade produzida pelas enterotoxinas de *S. aureus* não serem tão severos, quando comparados a outras enfermidades transmitidas por outros microrganismos, como *Listeria sp* e *Salmonella sp*, vários autores colocam esta enfermidade como responsável por uma das doenças mais preocupantes, pelos prejuízos que traz à saúde pública, e de ocorrência mais freqüente no mundo (DOYLE *et al.*, 1997; HOBBS & ROBERTS 1999; HOLECKOVÁ *et al.*, 2002; LONCAREVIC *et al.*, 2005).

Duzentos e quarenta e cinco cepas *S. aureus*, originárias de 3.748 amostras de alimentos, foram caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente, avaliando características que são de interesse em saúde pública e correlacionando-as entre si. Como resultado, obteve-se maior proveito dos dados obtidos pelos laboratórios oficiais, resultantes dos ensaios realizados rotineiramente, trazendo à tona outros enfoques relativos à presença de *S. aureus* em alimentos. Com isto, foram gerados dados epidemiológicos e de avaliação de risco a respeito das cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos no Brasil. Tendo em vista o fato de que a geração e disponibilização de dados como estes são extremamente raros no Brasil, a obtenção destes, por si só, já é estratégica para o país.



A utilização da técnica de PCR para monitoramento de presença de genes responsáveis pela transmissão de capacidade de produção de enterotoxinas e de resistências aos antimicrobianos será implementada no Lanagro/RS, sendo uma consequência imediata da realização deste trabalho.

A baixa prevalência (6,3%) de *S. aureus* das amostras deste estudo, mostrando um baixo risco de presença deste nos alimentos representados, provavelmente ocorreu por se tratarem de produtos com inspeção sanitária. Esta baixa prevalência apareceu mesmo incluindo produtos como carcaças e cortes de frango crus, que aumentaram este índice e são produtos que não estão mais incluídos entre os que sofrem análise rotineira de enumeração para este analito. Outros estudos mostram prevalências maiores de *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase positivos (de até 21%) em produtos de origem animal (ARAÚJO *et al.*, 2002; NORMANNO *et al.*, 2007; SIMON & SANJEEV, 2007). Ainda para reforçar o baixo risco associado ao consumo dos produtos representados neste estudo, a maior parte (mais de 85%) das contagens encontradas nos 6,5% de amostras que possuíam *S. aureus* eram inferiores a 9.900 ( $9,9 \times 10^3$ ), praticamente descartando o risco de produção das enterotoxinas (AKINEDEN *et al.*, 2008). Somente em 4 amostras (0,1 %) as contagens foram maiores que  $1,0 \times 10^5$  UFC/g, neste caso, apresentando risco real de já terem produzido a toxina.

As cepas que produziram as enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) foram em sua maioria de origem cárnea (77,78 %).

A porcentagem de cepas (aproximadamente 30%) que se mostraram capazes de produzir quantidades detectáveis de enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) mostra resultados compatíveis com os demonstrados (25 a 44%) por outros autores, em outros estudos, que trabalharam com amostras de alimentos (FUEYO *et al.*, 2005; SIMON & SANJEED, 2007; CARDOSO *et al.*, 1999).

Para detecção de enterotoxinas em caldos de cultivos de *S. aureus*, pode-se dizer que a utilização do ensaio automatizado utilizando VIDAS® SET2 possui alta especificidade, pois todas as cepas com resultados positivos mostraram, posteriormente, na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção dos genes (genes encoding staphylococcal enterotoxin) *sea*, *seb*, *sec-1*, *sed* e *see*, perfil gênico compatível, possuindo um ou mais de um destes.

Os genes que se mostraram mais prevalentes foram o *seb* e o *sec-1*, seguido do *sea*. Os genes responsáveis pela produção das SED e SEE (*sed* e *see*) mostraram-se pouco prevalentes nas cepas isoladas neste estudo, concordando com resultados de

outros estudos (AKINEDEN *et al.*, 2008; CHIANG *et al.*, 2008). No Brasil, existem poucos dados sobre prevalência destes genes em amostras de alimentos. Cunha *et al.* (2006) pesquisaram a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec-1* e *sed* em 20 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de amostras de alimentos. Entre as 20, 15% (n=3) apresentaram *sea* e 5 % (n=1) *sec-1*. Veras *et al.* (2007) em um estudo com 30 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos, representantes das amostras de produtos lácteos envolvidos em surtos de enfermidades alimentares ocorridos no Estado de Minas Gerais em um período de 4 anos, mostraram que 38 % amplificaram somente o gene *sea*, 29 % amplificaram somente *seb* e 24 % amplificaram *sea* e *seb* juntas. Os genes *sec* e *sed* praticamente não apareceram e *see* não foi estudado.

Vinte e duas cepas (27,16 %) apresentaram somente um dos genes, enquanto 72,84 % apresentaram combinações de frequências destes genes, sendo que a combinação mais frequente (40,74 % das cepas), foi a que continha os genes *sea*, *seb* e *sec* juntos.

Entre os produtos cárneos, a carne de frango e a Carne Mecanicamente Separada (CMS) de frango foram as que apresentaram maior frequência de isolamento de *S. aureus* e também o maior número de cepas enterotoxigênicas. Entretanto, em todas as amostras desses produtos, as contagens de *S.aureus* enterotoxigênico não ultrapassaram o limite de  $10^3$ . Entre os alimentos cárneos, apenas uma amostra de bacon, originária da região norte do país, apresentou isolamento de *S.aureus* enterotoxigênico associado à elevada contagem ( $>10^6$ ).

Entre os produtos lácteos, os índices mais elevados de isolamento de *S. aureus* ocorreram no queijo mussarela e queijo de coalho, entretanto observou-se que, na maioria das cepas isoladas, não foi possível detectar a capacidade de produzir as enterotoxinas pesquisadas. Por outro lado, todas as amostras de queijo de coalho com a presença de cepas enterotoxigênicas de *S.aureus* apresentavam populações superiores a  $10^5$  UFC/g. Três cepas de queijo de coalho, originárias da região nordeste, apresentaram isolamento de *S.aureus* enterotoxigênico associado à elevada contagem ( $>10^6$ ).

O problema de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tem sido exhaustivamente discutido no mundo todo. Wise *et al.* (1998), já alertavam de forma veemente a preocupação mundial com o fenômeno da resistência bacteriana e o grande número de conferências sobre o assunto. Conforme estes autores, o uso desnecessário de antimicrobianos, a falta de diagnósticos precisos, o uso de agentes antimicrobianos de amplo espectro (ao invés de específicos), a concentração dos indivíduos mais vulneráveis da sociedade (crianças e idosos) em locais de cuidados diários, a pressão da

indústria farmacêutica para o consumo indiscriminado de antimicrobianos e o uso destes como promotores de crescimento em criações animais foram os fatores que contribuíram para o desenvolvimento das resistências dos microrganismos. Conforme Lowy (2003), a facilidade e frequência com que as pessoas se deslocam em nível nacional e internacional colaborou para a transferência das resistências entre os microrganismos.

Muitos estudos já relataram a importância de se determinarem perfis de resistência entre cepas isoladas de alimentos (RAPINI *et al.*, 2004; LONCAREVIC *et al.*, 2005; NORMANNO *et al.*, 2007).

O presente estudo propiciou uma tentativa inicial de monitoramento do perfil de resistência a antimicrobianos usados para o tratamento de infecções estafilocócicas em humanos. A maioria dos isolados (64,1%) apresentou resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. O maior índice de resistência observado foi contra penicilina (30,2%). A resistência apenas à penicilina foi o perfil comum apresentado pelo maior número de isolados (n=23), não sendo observada a concentração desse perfil em grupo de isolados obtidos a partir de um alimento específico nem em uma região específica.

A porcentagem maior de isolados resistentes, em produtos originados das regiões sul e sudeste (70,0 e 67,9%, respectivamente), verificado no presente estudo, foi possivelmente relacionado à concentração, nessas regiões, da produção animal intensiva, que costuma levar ao uso mais frequente de antimicrobianos, aumentando a pressão de seleção de isolados resistentes. O mesmo motivo pode justificar a grande porcentagem (82,9%) de isolados resistentes entre os produtos de carne de frango envolvidos neste estudo.

A tendência de origem comum foi evidente em relação às quinolonas testadas no presente estudo (norfloxacin e ciprofloxacina), cujos isolados resistentes foram preponderantemente originados de produtos derivados de carne de frango. Entre os 48 isolados resistentes à norfloxacin, apenas quatro não eram originados desse tipo de produto, indicando uma possível associação. A elevada prevalência de isolados resistentes às quinolonas em frangos foi relatada anteriormente, onde 30% dos isolados de *S. aureus* de infecções foram resistentes à ciprofloxacina na Dinamarca (AARESTRUP *et al.*, 2000). No Brasil, a resistência às quinolonas em outras bactérias isoladas de aves também foi relatada, principalmente em isolados obtidos antes do início do controle rigoroso do uso de antimicrobianos na avicultura (OLIVEIRA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os perfis de resistência das cepas aos antimicrobianos parecem estar relacionados a vários fatores. Com os resultados deste e de outros estudos de resistências, fica evidente a necessidade de que se realizem estudos complementares, especialmente com *S. aureus*, para caracterização das chamadas cepas comunitárias, cepas originárias de criações animais e cepas de ambientes hospitalares e assemelhados, como tentativa de elucidar a forma e a importância das transmissões de resistências entre cepas de origens diversas.

Martineau *et al.* (2000), realizando estudo de resistências à oxacilina, eritromicina e gentamicina, por PCR multiplex, com 206 cepas de *S. aureus* e 188 cepas de *S. epidermidis*, todas de origem clínica, encontraram altos índices de correlação entre os resultados da presença dos genes responsáveis pelo desenvolvimento das resistências, por PCR multiplex e os resultados da análise fenotípica, por Disco-difusão: 98% para resistência à oxacilina, 100% para gentamicina e 98,5% para eritromicina, comprovando que a técnica de utilização de discos impregnados com o antimicrobiano em contato com as culturas bacterianas, desafiando seu crescimento em contato com estes, pode ser um bom indicador de resistência.

Rapini *et al.* (2004), ao trabalhar com resistência antimicrobiana de 45 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo de coalho no Nordeste do Brasil, também pela técnica de Disco-difusão, verificou elevado percentual de resistências aos 8 antimicrobianos testados. A ordem decrescente de resistência foi: Penicilina G (100%), Tetraciclina (91%), Vancomicina (75,5%), Gentamicina (71,1%), Oxacilina (66,7%), Eritromicina (60%), Cefalotina (48,9%) e Sulfasotrin (26,7%). Estes resultados contradizem os encontrados por Rapini *et al.* (2003), que verificaram elevada frequência de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru, queijo e manipuladores de alimentos (narinas, mãos e orofaringe) frente a 12 antimicrobianos.

Dantas *et al.* (2006), ao caracterizar fenotipicamente 140 amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal, em uma fábrica de laticínios em Goiás, no período de março de 2004 a fevereiro de 2005, utilizando o método de difusão em placas, encontrou todos os isolados susceptíveis à ciprofloxacina e gentamicina. Foi observada resistência em cinco (6,5%) isolados para eritromicina, 19 (24,7%) para tetraciclina, um (1,3%) para vancomicina, quatro (5,2%) para oxacilina e 53 (68,8%) para penicilina. Onze (14,3%) isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados e 18 (23,4%) foram resistentes a mais de um antibiótico. O antibiograma permitiu a classificação das cepas em doze perfis diferentes.

Kérouanton *et al.* (2007) caracterizaram 33 isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em 31 surtos de enfermidades produzidas por alimentos, que ocorreram entre os anos de 1981 a 2002, na França. Dentre as características estudadas estava a investigação da resistência a antimicrobianos, que foi realizada pela técnica de disco-difusão, tendo sido utilizada penicilina G, cefoxitina, tetraciclina, canamicina, gentamicina, ertitromicina, clindamicina, rifampicina e cloranfenicol, entre outros. Dezenove isolados foram resistentes à penicilina (57,6%), 4 foram resistentes à tetraciclina (12,1%) e 6 foram resistentes à canamicina (6,1%). Duas cepas foram suscetíveis a todos os antimicrobianos, sais de metais pesados e biocidas catiônicos (os autores também testaram a resistência a algumas destas substâncias) utilizados.

De forma geral, os índices de resistência apresentados pelos isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos não estiveram em níveis superiores aos relatados na literatura, e bem abaixo dos isolados desse microrganismo obtidos de humanos. Os perfis de resistências das cepas deste estudo têm algumas características peculiares, que nos levam a pensar na importância de portadores humanos (manipuladores) e animais (matéria-prima) e na necessidade de estudos complementares.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho, pode-se concluir que o risco de estarem presentes enterotoxinas nos alimentos de origem animal que passam por processos de industrialização controlados e acompanhados pelo Serviço Oficial de Inspeção brasileiro é muito baixo. Entretanto, uma vez que foram detectados diversos perfis de resistência a antimicrobianos nos isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos, a possibilidade de veiculação e disseminação, através de alimentos de origem animal, dessas cepas resistentes pode existir e deve ser monitorada.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta diagnóstica importante em microbiologia, podendo ser utilizada como triagem, diagnóstico definitivo ou caracterização complementar de cepas.

Há necessidade de aprofundamento de informações sobre determinados analitos buscados nas análises microbiológicas de alimentos realizadas rotineiramente; apesar de

que a presença de microrganismos em determinadas concentrações é uma indicadora da existência de risco de transmissão de doenças de origem alimentar.

Em cepas de coleções, devem ser completadas informações básicas obtidas em ensaios rotineiros. Estas informações enriquecem o conhecimento acerca de como se distribuem, como se comportam, que características ou habilidades ligadas à patogenia possuem e qual o risco associado quando estas cepas se encontram em alimentos.

Existe a perspectiva da realização de PCR para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nas cepas que não se mostraram produtoras das enterotoxinas clássicas.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP F. M. The Origin, Evolution and Local and Global Dissemination of Antimicrobial Resistance. In: AARESTRUP Frank. M. (Ed.). **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington DC: ASM Press, 2006. p. 339-359.
- AARESTRUP F.M.; AGERSO Y.; CHRISTENSEN J.C.O.; MADSEN M. & JENSEN, L.B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**. v.74, p. 353-364, 2000.
- ADCOCK P. M.; PASTOR, P.; MEDLEY, F.; PATTERSON, J. E.; MURPHY, T. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. **Journal of Infection Disease**, v.178, p. 577-580, 1998.
- AKINEDEN, Ö.; ABDULWAHED, A. H.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 211-216, 2008.
- ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P., FREITAS-ALEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese comercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1172-1177, 2002.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; JAROSLAW, B.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLENDNA, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36-41, 2006.
- BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxins genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.2548-2553, 1998.
- BENNETT, R.W. Staphylococcal Enterotoxins: Micro-slide Double Diffusion and ELISA-based Methods. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2001. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)>. Acesso em janeiro de 2009.
- BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2001. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)>. Acesso em janeiro de 2009.
- BERGDOLL, M. S. Enterotoxins. In: Adlam, C. and Easmon, C. S. F (Eds.), **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. London: Academic Press Inc., 1983. v. 2, p. 559-598, 1983.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus* In: Doyle, M. P. (Ed.), **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463-523.

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

BIEDENBACH, D. J.; BELL, J. M.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J. D. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacterial isolates from the Asia-Pacific region and an in vitro evaluation of the bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin: a SENTRY Program Report (2003-2004). **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 143-149, 2007.

BIOMERIEUX ® SA. **Manual descritivo da Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) do Sistema VIDAS® Staph enterotoxin II REF 30 705**. bioMérieux SA: Français, 2006. 6 p.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seI* in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, p. 719-730, 2004.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; VON EIFF, C.; VILLANI, F.; BECKER, K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. **Applied and Environmental Microbiology** v. 72(9), p. 6117-6123, 2006.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, p. 31-40, 2003.

BORST, D. W.; BETLEY, M. J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. **Infection and Immunity**. v. 62, p. 113-118, 1994.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. Portaria 146 de 07 de março de 1996 – Aprova os **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de dos Produtos Lácteos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de mar., 1996. Seção I, 3977.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2001. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 - **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil,



Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de jan., 2001. Seção I, 45-53.

CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; ÖSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, p. 315-321, 1999.

CARDOSO, H. F. T.; SILVA, N.; SENA, M. J.; CARMO, L. S. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 347-349, 1999.

CHA, J. O. ; LEE, J. K.; JUNG, Y. H.; YOO, J. I.; PARK, Y. K.; KIM, B. S.; LEE, Y. S. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101(4), p. 864-871, 2006.

CHAMBERS, H. F. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7 (2), p. 178-182, 2001.

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

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

CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Document M2-A8 - **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard** – Eight Edition. v. 23, n. 1, 2003.

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

DANTAS, M. C.; ANDRÉ, P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI A. B. Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Manipuladores , Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43 (suplemento), p. 102-108, 2006.

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

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington D.C.: ASM Press, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA GADO DE LEITE. Informações Técnicas/Estatísticas do Leite. Leite industrializado por

estabelecimentos de laticínios sob inspeção no Brasil –1999/2008. **Leite em Números/Indústria**, Disponível em <<http://www.cnpqi.embrapa.br>>. Acesso em fevereiro de 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in Salmonella and Campylobacter isolates from food animals in the European Union. **Clinical Microbiology Infections**; v. 14, p. 522–533, 2008.

FIGUEROA, G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAUNDEZ, G. Carriage of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Revista Medica de Chile**, Santiago, v. 130, p. 859-864, 2002.

FILIOUSIS, G.; JOHANSSON, A.; FREY, J.; PERRETEN, V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v. 20, p. 314–317, 2009.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**. v. 7, p. 187-194, 2005.

GANDRA, E. A.; SILVA, J. A.; MACEDO, M. R. P.; ARAÚJO, M. R.; MATA, M. M.; SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**, v.10 (1), p. 75-81, 2005.

GARAU, J. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. **Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14 (1), p. 198–202, 2008.

GUNN, B. A. Culture Media, Tests, and Reagents in Bacteriology. In: HOWARD, B.J.; KEISER, J.F.; SMITH, T.F.; WEISSFELD, A.S.; TILTON, R.C. (Eds.). **Clinical and Pathogenic Microbiology**. 2<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 1994. p. 863-912.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. 6. ed. São Paulo: Varela, 1999. 376 p.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, n. 9, p. 179-182, 2002.

HOOKEY, J.V.; EDWARDS, V.; PATEL, S.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) to characterise methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, n. 37, p. 7-15, 1999.

HOWARD, B. J.; KLOOS, W.E. *Staphylococci*. In: HOWARD, B.J.; KEISER, J.F.;

SMITH, T.F.; WEISSFELD, A.S.; TILTON, R.C. (Eds.). **Clinical and Pathogenic Microbiology**. 2<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 1994, p. 243-256.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 2793-2795, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários – Brasil – 1970-2006. **Indicadores/Censos Agropecuários**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em janeiro 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA, SÃO PAULO. Surtos de intoxicação alimentar causados por toxina de *S. aureus* na grande São Paulo, no período de março de 1990 a junho de 1997. **Seção de Microbiologia Alimentar**, disponibilizado em julho de 2006

IP, M.; LYON, D.J.; CHIO, F.; ENRIGHT, M.C.; CHENG, A.F. Characterization of isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Hong Kong by phage typing, Pulsed-field gel electrophoresis, and Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.11, p. 4980-4985, nov. 2003.

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

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of Genes For Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29(3), p. 426-430, 1991.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **Federation of European Microbiological Societies - FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 267-272, 2005.

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

KIM, J. S.; SONG, W.; KIM, H. S.; CHO, H. C.; LEE, K. M.; CHOI, M. S.; KIM, E. C.; Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin genes profiles. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56(3), p. 289-295, 2006.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988, 783 p.

KUCHENBECKER, B.S.; FONSECA, S.H.; TOCHETTO, L.G.; SCHUCH, D.M.T.; LAURINO, J.P.; CARDOSO, M. Microbiological Quality Assessment of Different Types of Cheese. In: SEMINÁRIO LATINO AMERICANO Y DEL CARIBE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XIII, 2004, Montevideo. **Anais**. Montevideo: Sociedad Uruguaya de Ciência y Tecnología de Alimentos, Asoc. Latinoamericana y Del Caribe de Ciência y Tecnología de los Alimentos, n. 69, 2004.

KWON, N. H.; PARK, K. T.; MOON, J. S.; JUNG, W. K.; KIM, S. H.; KIM, J. M.; HONG, S.K.; KOO, H. C., YI SEOK JOO, Y. S.; PARK, Y. H. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 624–632, 2005.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus aureus* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 702-709, 2005.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: FRANCES, P.D.; KEITH, I. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. p. 387-403.

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

LESSING, M.P.A.; JORDENS, J.Z.; BOWLER, I.C.J. Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst patients and staff. **Journal of Hospital Infection**, v. 31, p. 253-260, 1995.

LIVERMORE, D. M., 2007. Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29 (3), p. S1-S7, 2007.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; RORVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 344-350, 2005.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infection. **New England Journal of Medicine**, v.111, p. 1265-1273, 1998.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p. 1265-1273, 2003.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912 p.

- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial agents and Chromotherapy**, v. 44(2), p. 231-238, 2000.
- MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1032-1035, 2000.
- MEMPEL, M.; LINA, G.; HOJKA, M.; SCHNOPP, C.; SEIDL, H.; P.; SCHAFER, T.; RING, J.; VANDENESCH, F. High prevalence of superantigens associated with the eeg locus in *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic eczema. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 306-309, 2003.
- MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; JOO, Y. S.; PARK, Y. H.; KIM, M. N.; KOO, H. C. Antibigram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1716-1724, 2007.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIOLI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66-72, 2007.
- MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62(2), p. 1181-1187, 2008.
- MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C., CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.
- MYLOTTE, J. M.; MCDERMOTT, C.; SPOONER, J. A. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, p. 891-907, 1987.
- NAGACHINTA, S.; CHEN, JR. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 72(1), p. 21-27, 2009.
- NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 292-299, 2007.

NÓGRÁDY, N.; KARDOS, G.; BISTYÁK, A.; TURCSÁNYI, I., MÉSZÁROS, J.; GALÁNTAI, Z., JUHÁSZ, A.; SAMU, P., KASZANYITZKY, J. E.; PÁSZTI, J., KISS, I. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken–human food chain in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 162–167, 2008.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 290-296, 2007.

OLIVEIRA S.D.; FLORES F.S.; DOS SANTOS L.R. & BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 297-305, 2005.

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos e Zoonosis. **Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores**. Organización Panamericana de la Salud, 1996. 176 p.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56 (1), p.130-133, 2004.

RIBEIRO A.R.; KELLERMANN A.; SANTOS L.R. & NASCIMENTO V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1259-1262, 2008.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde – Coordenação de Controle de Doenças Transmissíveis Agudas, 2001. **Distribuição anual dos surtos investigados de doenças transmitidas por alimentos, segundo o agente etiológico, RS, 1987-2000**. Disponibilizado em 2006.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, p. 3217-3219, 1992.

SALYERS, A.A; WHITT, D.D. Disease without colonization; food-borne toxinoses caused by *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*. In: **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. Washington: ASM, 1994. p. 130-140.

SCHAFER, W. M.; IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for *Staphylococcus* enterotoxin B. **Infection and Immunity**, v. 20, p. 273-278, 1978.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotyping characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 101-107, 2004.

SHAPTON, D.A.; SHAPTON, N.F. Pathogenicity and pathogen profiles. In: **Principles and Practices for the Safe Processing of Foods**. London: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 283-298.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN JR, J. F.; CRAIG, W. A.; BORNSTEIN, D. L.; DUNCAN, R. A.; ECKMAN, M. R.; FARRER, W. E.; GREENE, W. H.; LORIAN, V.; LEWY, S.; MCGOWAN JR, J. E.; PAUL, S. M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F. C.; WATANAKUNAKORN, C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 594-599, 1997.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

TROVÓ FABIANO, T.L.; LEMOS, M.V.F.; GIVISIEZ, P.E.N. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of human and animal *Staphylococcus aureus* isolates from dairy farms with manual milking. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 57-63, 2005.

VARNAM, A.H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens – An Illustrated Text**. London: Wolf Publishing, 1991. p. 235-265.

VERA-CABRERA, L.; DAW-GARZA, A.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; LOZANO-GARZA, H. G.; DE TORRES, N. W.; ROCHA, N. C.; OCAMPO-CANDIANI, J.; CHOI, S. H.; WELSH, O. Therapeutic Effect of a Novel Oxazolidinone, DA-7867, in BALB/c Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2(9) p.289, 2008.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; LAWRENCE, C. T.; JEFFREY, W. S.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brasil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

WISE, R.; HART, T.; CARS, O.; STREULENS, M.; HELMUTH, R.; HUOVINEN, P.; SPRENGER, M. Antimicrobial resistance. **British Medical Journal**, v. 317: p. 609-610, 1998.

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



## APÊNDICE A:

Quadro demonstrativo com os resultados da caracterização bioquímica dos 245 isolados de *Staphylococcus aureus*

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
1	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	2,3 x10 <sup>2</sup>
2	NT	T	P	P	N	N	N	NR	Queijo de coalho	1,1 x10 <sup>3</sup>
3	NT	A	P	P	N	P	P	P P P N N	Queijo mussarella	1,4 x10 <sup>2</sup>
4	NT	T	N	P	N	P	N	NR	Leite em pó integral	1,5 x10 <sup>2</sup>
5	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	2,3 x10 <sup>3</sup>
7	NT	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Bacon	>2,0 x10 <sup>6</sup>
8	NT	A	P	N	N	P	P	P P P N N	Queijo mussarella	1,4 x10 <sup>2</sup>
9	NT	T	N	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho	1,5 x10 <sup>5</sup>
10	NT	T	P	N	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	7,0 x10 <sup>5</sup>
11	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	4,1 x10 <sup>3</sup>
12	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	1,0 x10 <sup>2</sup>
13	NT	T	N	N	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	2,0 x10 <sup>6</sup>
14	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	2,0 x10 <sup>5</sup>
16	NT	A	P	P	N	P	P	P P P N N	Bexiga natatória seca	5,2 x10 <sup>2</sup>
17	NT	A	P	N	N	P	N	NR	Queijo mussarella	8,0 x10 <sup>2</sup>
18	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo prato lanche	4,0 x10 <sup>2</sup>
19	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho	>2,0 x10 <sup>6</sup>
20	NT	T	P	P	P	N	N	NR	Queijo de coalho	5,6 x10 <sup>5</sup>
21	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijode coalho	>2,0 x10 <sup>6</sup>
22	NT	A	P	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	2,2 x10 <sup>2</sup>

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
25	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	$3,0 \times 10^3$
27	NT	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho	$2,0 \times 10^2$
28	NT	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Queijo mussarella	$2,0 \times 10^4$
1	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho	$>1,0 \times 10^5$
4	NE	A	P	N	P	P	N	NR	Queijo de coalho	$>1,0 \times 10^5$
6	NE	T	P	N	P	P	N	NR	Queijo de coalho	$>1,0 \times 10^5$
9	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
10	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Frango	$3,0 \times 10^2$
13	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Frango	$1,6 \times 10^3$
15	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho	$2,9 \times 10^6$
17	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça	$8,6 \times 10^3$
20	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho	$2,9 \times 10^5$
22	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
23	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
24	NE	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
25	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
26	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
27	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
28	NE	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
29	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
30	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
31	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
32	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
33	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
34	NE	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
35	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
36	NE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
37	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
38	NE	T	P	P	P	P	N	NR	Queijo de coalho (D)	$>1,0 \times 10^5$
39	NE	T	P	P	N	P	P	P N N N N	Frango	$1,0 \times 10^3$
1	S	T	P	P	N	P	N	NR	Corte congelado frango	$1,0 \times 10^2$
2	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	$2,0 \times 10^2$
3	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça suína	$1,7 \times 10^3$
4	S	T	P	P	N	P	N	NR	Corte resfriado de frango	$2,0 \times 10^2$
5	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango resfriado	$3,2 \times 10^4$
6	S	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Carne eqüina	$1,0 \times 10^2$
7	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	$3,0 \times 10^2$
8	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	$4,0 \times 10^2$
9	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango congelado	$2,5 \times 10^4$
10	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	$1,0 \times 10^2$
11	S	A	P	P	N	P	P	N P N N N	CMS	$1,0 \times 10^2$
12	S	T	P	N	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$1,6 \times 10^3$
13	S	T	P	N	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$7,0 \times 10^2$
14	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$9,3 \times 10^2$
15	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	$8,0 \times 10^2$
16	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$1,0 \times 10^2$
17	S	A	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$5,0 \times 10^2$
18	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$5,0 \times 10^2$
19	S	T	P	P	N	P	P	N N N P N	Lingüiça de carne suína	$8,0 \times 10^2$
20	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	$1,0 \times 10^3$
21	S	T	P	N	N	P	N	NR	Lingüiça de carne	$1,0 \times 10^2$

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
									suína	
22	S	T	P	N	N	P	N	NR	Frango congelado	1,0 x10 <sup>2</sup>
23	S	A	P	P	N	P	N	NR	CMS	1,2 x10 <sup>3</sup>
24	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango resfriado	1,0 x10 <sup>2</sup>
25	S	T	P	P	N	P	N	NR	Corte congelado de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
26	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,6 x10 <sup>3</sup>
27	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango resfriado	8,0 x10 <sup>2</sup>
28	S	T	N	P	N	P	N	NR	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
29	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
30	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango congelado	4,0 x10 <sup>2</sup>
31	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	5,0 x10 <sup>2</sup>
32	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	1,1 x10 <sup>3</sup>
33	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	9,0 x10 <sup>2</sup>
34	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	6,0 x10 <sup>2</sup>
35	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>3</sup>
36	S	T	P	P	N	P	N	NR	Salsicha	1,0 x10 <sup>2</sup>
37	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>3</sup>
38	S	T	P	N	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>3</sup>
39	S	T	P	N	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
41	S	T	P	N	N	P	N	NR	CMS	1,0 x10 <sup>3</sup>
42	S	A	P	N	N	N	N	NR	Charque	1,0 x10 <sup>2</sup>
44	S	T	P	P	N	P	P	P N N N N	CMS	3,0 x10 <sup>2</sup>
46	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
48	S	T	P	N	N	P	N	NR	Frango congelado	2,0 x10 <sup>2</sup>
49	S	T	P	P	N	P	P	N N P N N	Corte resfriado de frango	1,4 x10 <sup>3</sup>
50	S	T	P	P	N	P	P	N N P N N	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
51	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	3,0 x10 <sup>2</sup>
52	S	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Peru resfriado	1,0 x10 <sup>2</sup>
53	S	T	P	P	N	P	P	N N P N N	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
55	S	T	P	N	N	P	N	NR	Salsicha	>2,0 x10 <sup>4</sup>
56	S	T	P	N	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	4,0 x10 <sup>2</sup>
58	S	T	P	P	N	P	N	NR	Charque	3,0 x10 <sup>3</sup>
59	S	T	P	P	N	P	P	P P N N N	Hambúrgu	1,0 x10 <sup>2</sup>

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
									er	
60	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango resfriado	2,0 x10 <sup>2</sup>
61	S	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Frango resfriado	1,0 x10 <sup>2</sup>
62	S	T	P	N	N	P	N	NR	Frango congelado	1,0 x10 <sup>2</sup>
63	S	T	P	P	N	P	N	NR	Salame pepperoni	3,5 x10 <sup>3</sup>
64	S	T	P	P	N	P	N	NR	Frango resfriado	1,0 x10 <sup>2</sup>
65	S	T	P	P	N	P	N	NR	Corte resfriado de frango	2,0 x10 <sup>2</sup>
66	S	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo prato fatiado	1,0 x10 <sup>3</sup>
67	S	T	P	P	N	P	N	NR	Lingüiça de carne suína	1,0 x10 <sup>2</sup>
68	S	T	P	P	N	N	N	NR	Corte congelado de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
69	S	T	P	N	N	P	N	NR	Frango congelado	1,0 x10 <sup>2</sup>
70	S	T	P	P	N	P	P	N P P N N	CMS	8,0 x10 <sup>2</sup>
71	S	T	P	P	N	N	N	NR	Lingüiça mista defumada	1,0 x10 <sup>2</sup>
72	S	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
73	S	T	P	P	N	N	N	NR	Queijo lanche fatiado	>2,0 x10 <sup>5</sup>
74	S	T	P	N	N	P	P	P N P N N	Corte resfriado de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
75	S	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Frango resfriado	2,0 x10 <sup>2</sup>
77	S	T	P	P	N	P	N	NR	Corte congelado de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
78	S	T	P	N	N	P	N	NR	Frango congelado	5,0 x10 <sup>2</sup>
79	S	T	P	N	N	P	N	NR	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
80	S	T	P	N	N	P	N	NR	Queijo lanche	1,0 x10 <sup>2</sup>
81	S	T	P	N	N	P	N	NR	Queijo prato lanche	2,0 x10 <sup>2</sup>
83	S	T	P	P	N	N	P	N P P N N	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
84	S	T	P	P	N	P	P	P P N N N	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
85	S	T	P	P	N	N	N	NR	Salsicha	1,0 x10 <sup>2</sup>
86	S	T	P	P	N	N	N	NR	Ricota	2,0 x10 <sup>3</sup>
87	S	T	P	P	N	P	P	P N N N N	Salaminho de javali	3,0 x10 <sup>2</sup>
88	S	T	P	P	N	N	P	P P P N N	Charque	1,0 x10 <sup>2</sup>
90	S	T	P	P	N	P	P	P P N N N	Paio	1,0 x10 <sup>2</sup>
91	S	T	P	P	N	P	P	P P P N N	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
92	S	T	P	P	N	P	N	NR	Costela salgada de suíno	1,0 x10 <sup>2</sup>
1	SE	T	P	POS	N	P	N	NR	Jerked beef	3,6
4	SE	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Embutido cozido bovino	93,0
7	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo parmesão ralado	2,0 x10 <sup>4</sup>
9	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	2,0 x10 <sup>2</sup>
11	SE	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,1 x10 <sup>3</sup>
12	SE	T	N	P	N	P	P	N P N N N	Embutido frescal suíno	1,0 x10 <sup>4</sup>
13	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo parmesão ralado	1,0 x10 <sup>3</sup>
14	SE	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	2,0 x10 <sup>2</sup>
15	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	1,0 x10 <sup>2</sup>
16	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Pizza mussarela	9,1
17	SE	T	P	P	N	P	P	N N P N N	Pizza calabresa	20,0
18	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Pizza presunto	3,6
19	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Filé de peixe elaborado com óleo	3,0
21	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Jerked beef	3,6
23	SE	A	N	N	P	P	N	NR	Sobremesa láctea	3,0
24	SE	T	P	P	N	P	P	P N N N N	Queijo prato	3,6
26	SE	A	N	N	P	P	N	NR	Queijo minas padrão	11,0
27	SE	A	N	N	P	P	N	NR	Requeijão	3,6
28	SE	A	N	N	P	P	N	NR	Queijo	3,6

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
									cottage	
29	SE	T	N	P	N	P	N	NR	Queijo prato	3,6
30	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	23,0
31	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina moída	5,0 x10 <sup>3</sup>
32	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Miúdos bovinos	2,0 x10 <sup>2</sup>
34	SE	T	N	P	N	P	P	N P N N N	Espeto de carne bovina	15,0
35	SE	T	N	P	N	P	N	NR	Jerked beef	3,6
36	SE	T	P	P	N	P	P	P P N N N	Queijo parmesão ralado	7,0 x10 <sup>4</sup>
37	SE	T	P	P	N	P	P	N N P N N	Embutido cozido bovino	14,0
38	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	2,0 x10 <sup>2</sup>
39	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Gema Past. c/sal	3,6
41	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	CMS	3,0 x10 <sup>2</sup>
42	SE	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	5,8 x10 <sup>3</sup>
43	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Espeto de carne bovina	2,0 x10 <sup>2</sup>
44	SE	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Envoltório salgado	9,1
45	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Jerked beef	11,0
47	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Embutido frescal misto	1,0 x10 <sup>2</sup>
48	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Jerked beef	3,0
49	SE	A	P	P	N	P	P	N P P N N	Cortes de ave	7,0 x10 <sup>2</sup>
50	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Espeto de carne bovina	5,6 x10 <sup>2</sup>
51	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Jerked beef	20,0
52	SE	A	P	P	N	P	P	N P P N P	Carne bovina	3,6
53	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	150,0
54	SE	A	N	N	P	N	N	NR	Queijo minas frescal	4,9 x10 <sup>5</sup>
55	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Embutido frescal	1,7 x10 <sup>3</sup>

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
									suíno	
56	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Envoltório salgado	3,6
57	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Queijo prato	3,6
58	SE	T	P	P	N	P	P	N N P N N	Miúdos bovinos	4,2 x10 <sup>3</sup>
59	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina moída	1,0 x10 <sup>2</sup>
60	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	23,0
62	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Carcaça de frango	3,0 x10 <sup>2</sup>
64	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Hambúrguer bovino	4,0 x10 <sup>2</sup>
65	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N P	Queijo provolone	3,6
66	SE	T	P	P	N	P	P	N P P N N	Cortes de ave	1,0 x10 <sup>2</sup>
67	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	39,0
68	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Embutido frescal suíno	1,0 x10 <sup>2</sup>
69	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Embutido frescal suíno	1,0 x10 <sup>2</sup>
70	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Embutido frescal bovino	75,0
71	SE	T	P	N	N	P	P	P P P N N	Barrinha de peixe empanada	7,3
72	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	3,6
73	SE	T	P	P	N	P	P	N P N N N	Filé de peixe elaborado com azeitona	9,1
74	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
75	SE	T	P	P	N	P	POS	N P N N N	Carne bovina moída	2,0 x10 <sup>2</sup>
76	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Piz. Cal.	9,1
77	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Jerked beef	3,6
78	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne de frango empanada	3,6

Continua...



Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
79	SE	A	P	P	N	P	N	NR	Miúdos bovinos	3,0 x10 <sup>2</sup>
80	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Jerked beef	9,1
81	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
82	SE	T	P	N	N	P	N	NR	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>3</sup>
83	SE	T	N	P	N	P	N	NR	Queijo minas frescal	1,0 x10 <sup>2</sup>
84	SE	T	N	P	N	P	N	NR	Queijo mussarella	3,6
85	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	14,0
86	SE	T	N	P	N	P	N	NR	Carne suína	3,6
87	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	CMS	9,0 x10 <sup>2</sup>
88	SE	T	P	N	N	P	N	NR	Carcaça de frango	5,0 x10 <sup>2</sup>
89	SE	T	P	P	N	P	N	NR	CMS	1,0 x10 <sup>2</sup>
90	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N P	Embutido frescal suíno	1,0 x10 <sup>2</sup>
91	SE	A	P	P	N	P	P	P P P N N	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>3</sup>
92	SE	T	P	P	N	N	P	P P P N N	Carne suína	7,3
93	SE	T	N	P	N	P	P	P P P N N	Carne bovina	43,0
94	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
95	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Embutido cozido suíno	3,0
96	SE	T	P	N	N	N	N	NR	Carne bovina	11,0
97	SE	T	P	N	N	P	P	P P P N N	Embutido frescal suíno	3,0 x10 <sup>2</sup>
98	SE	T	P	P	P	P	P	P P P N N	Carne ovina	3,6
99	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Carne bovina moída	1,0 x10 <sup>3</sup>
101	SE	T	P	P	P	P	P	P P P N N	Gema Pasteurizada c/sal	9,1
102	SE	T	P	P	P	P	P	P P P N N	Pato congelado	1,0 x10 <sup>2</sup>
103	SE	T	P	P	P	P	N	NR	Embutido frescal de	3,0 x10 <sup>2</sup>

Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSAVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
									aves	
104	SE	T	P	P	P	P	P	P P P N N	Hambúrguer bovino	1,0 x10 <sup>2</sup>
105	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Embutido frescal suíno	4,0 x10 <sup>2</sup>
106	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
107	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	7,3
108	SE	T	P	P	P	P	P	P P P N N	Jerked beef	3,6
109	SE	T	N	P	P	P	P	P P P N N	Queijo minas padrão	3,6
110	SE	T	P	N	N	P	P	P P P N N	Embutido frescal suíno	1,0 x10 <sup>2</sup>
111	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	CMS	1,4 x10 <sup>3</sup>
112	SE	T	P	P	N	N	N	NR	Carcaça de frango	2,0 x10 <sup>2</sup>
113	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carcaça de frango	2,0 x10 <sup>2</sup>
114	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carcaça de frango	2,0 x10 <sup>2</sup>
115	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Hambúrguer bovino	2,0 x10 <sup>2</sup>
116	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Cortes de ave	1,0 x10 <sup>3</sup>
117	SE	T	N	P	N	P	P	P P P N N	Envoltório salgado	9,1
118	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Carne bovina	9,1
119	SE	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Carne bovina	15,0
120	SE	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Carne bovina	3,6
121	SE	T	P	P	N	P	P	N N P N N	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
122	SE	T	P	P	N	P	P	P N P N N	Leite em pó desnatado	3,6
123	SE	T	N	P	N	P	P	P P P P N	Carcaça de frango	1,0 x10 <sup>2</sup>
124	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Cortes de ave	1,0 x10 <sup>2</sup>
125	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Carne bovina moída	1,0 x10 <sup>2</sup>

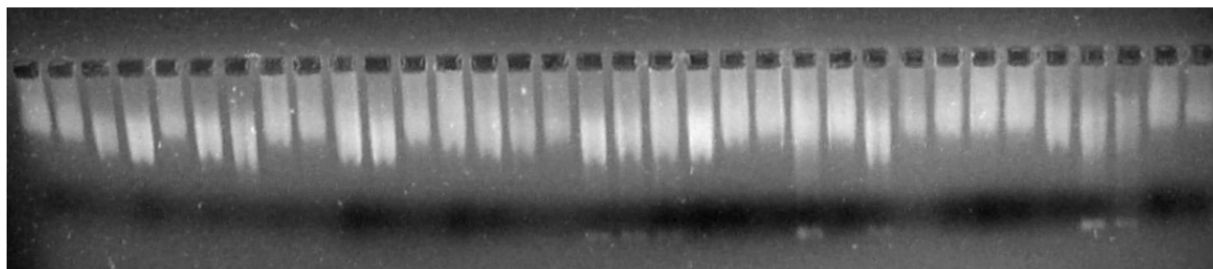
Continua...

Nº AMOSTRA	REGIÃO DE ORIGEM DA AMOSTRA	ASPECTO BP	PRODUÇÃO PIGMENTO CAROTENÓIDE	DNASE	ONPG	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DA MALTOSE	RESULTADO ENS. IM.	PCR GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO ENTEROTOXINAS A B C D E	ORIGEM DO ISOLADO	CONTAGENS
126	SE	T	P	P	N	P	P	P P P N N	Carne bovina	3,6
127	SE	T	P	P	N	P	N	NR	Carne bovina	3,6

Legenda: NT: Região Norte do Brasil, NE: Região Nordeste do Brasil, S: Região Sul do Brasil, SE: Região Sudeste do Brasil, T: Colônias Típicas, A: Colônias Atípicas, P: Positivo, N: Negativo,

## APÊNDICE B

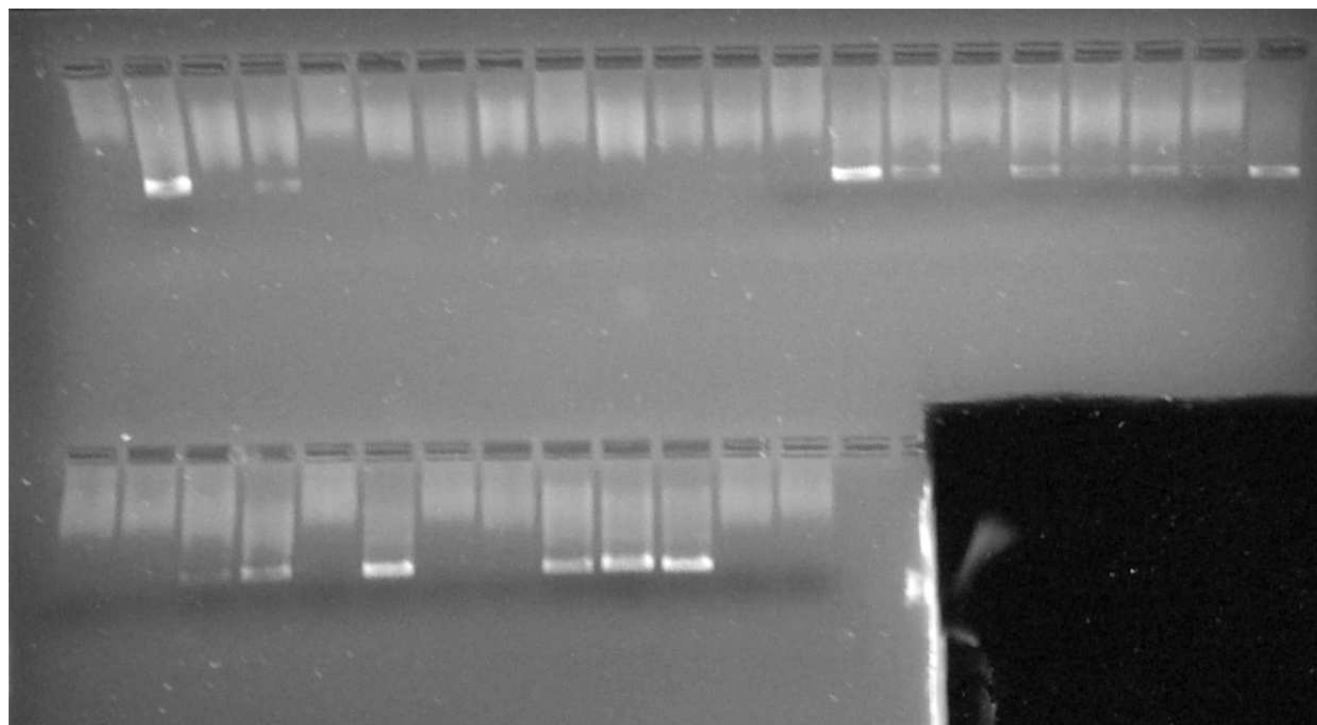
Exemplo de visualização dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers do gene da enterotoxina A (*sea*). As duas últimas amostras são os controles negativos e as duas anteriores a estas são os controles positivos.



↑ ↑ ↑ ↑  
Cont. Cont.  
Pos. Neg.

## APÊNDICE C

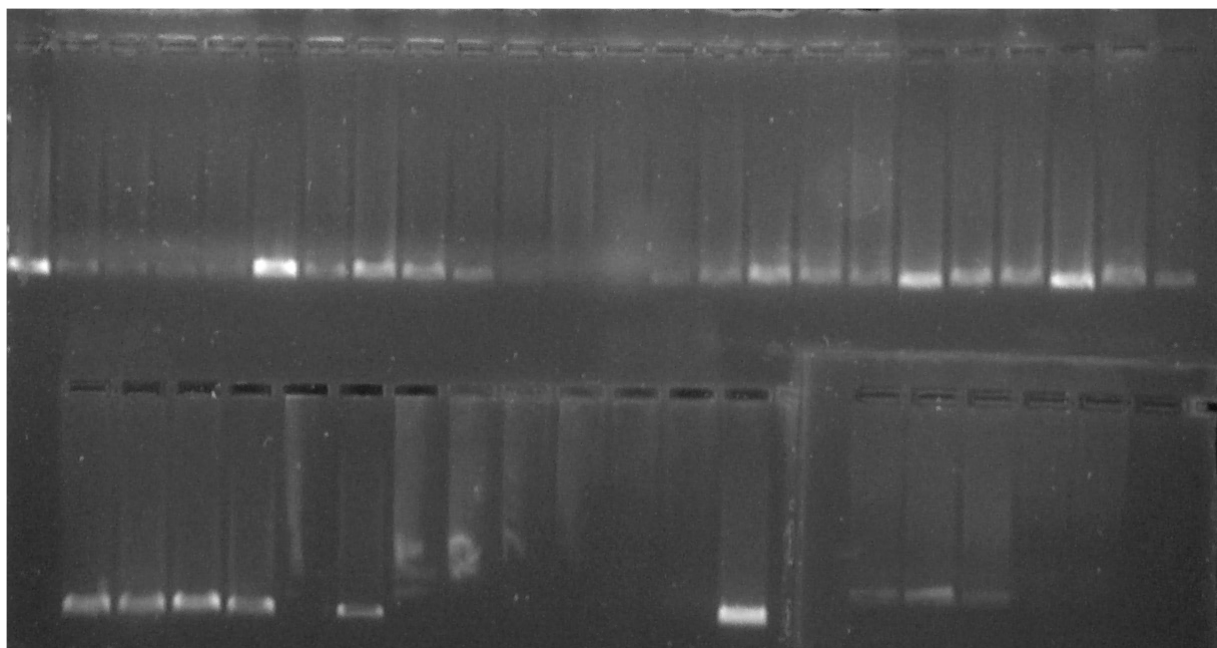
Exemplo de visualização dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers do gene da enterotoxina B (*seb*). As duas últimas amostras são os controles negativos e as duas anteriores a estas são os controles positivos.



↑    ↑    ↑    ↑  
Controles    Controles  
Positivos    Negativos

## APÊNDICE D

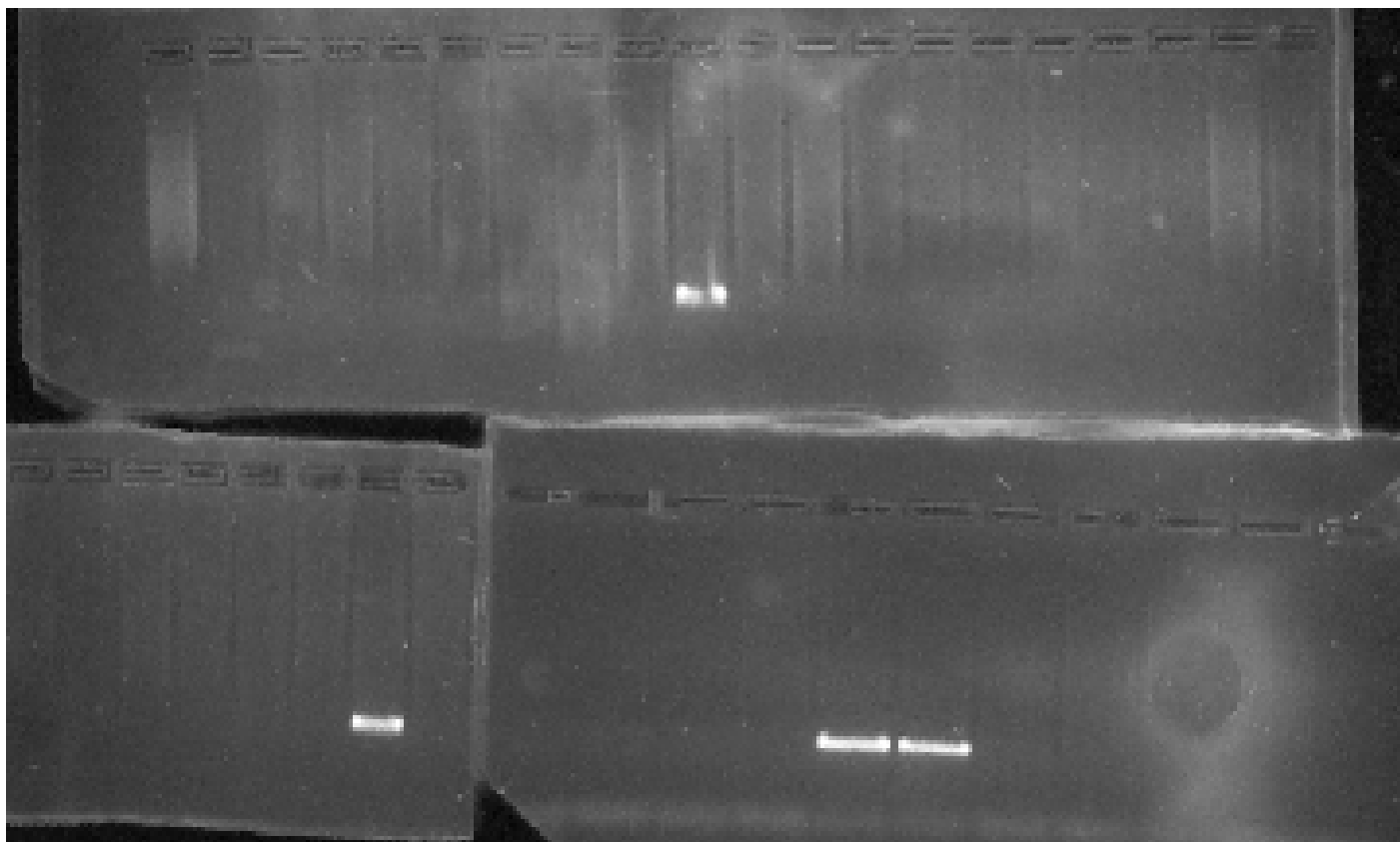
Exemplo de visualização dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers do gene da enterotoxina C (*sec*). As duas últimas amostras são os controles negativos e as duas anteriores a estas são os controles positivos



↑    ↑    ↑    ↑  
Controles    Controles  
Positivos    Negativos

## APÊNDICE E

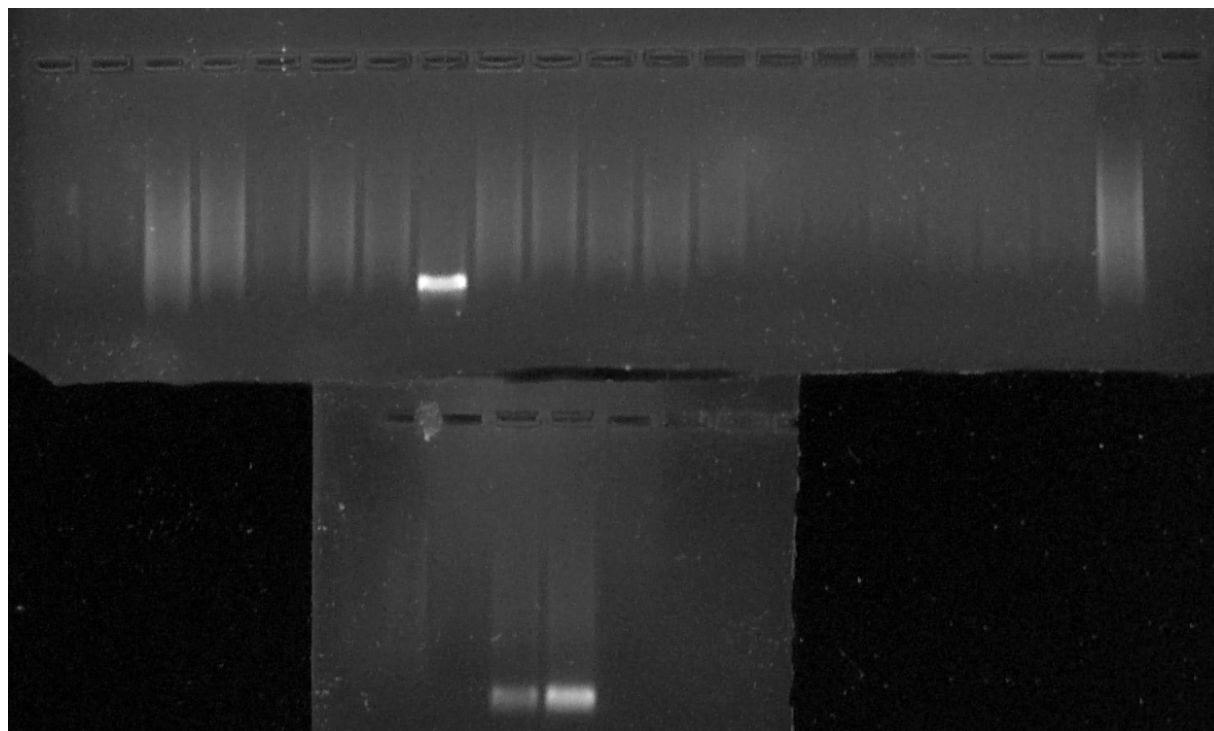
Exemplo de visualização dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers do gene da enterotoxina D (*sed*). As duas últimas amostras são os controles negativos e as duas anteriores a estas são os controles positivos



↑            ↑            ↑            ↑  
Controles    Controles  
Positivos    Negativos

## APÊNDICE F

Exemplo de visualização dos fragmentos amplificados resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers do gene da enterotoxina E (*see*). As duas últimas amostras são os controles negativos e as duas anteriores a estas são os controles positivos



↑ ↑    ↑ ↑  
Controles    Controles  
Positivos    Negativos



## ANEXO 1

**Tabela 1: Seqüência de bases dos primers utilizados nesse estudo e tamanho estimado dos produtos da amplificação.**

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho do produto de amplificação	Referência
<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	Johnson <i>et al</i> (1991)
	SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478	Johnson <i>et al</i> (1991)
	SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec-1</i>	SEC-1	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	257	Johnson <i>et al</i> (1991)
	SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	Johnson <i>et al</i> (1991)
	SED-2	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	SEE-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	170	Johnson <i>et al</i> (1991)
	SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCTTC		