

11

CAPÍTULO

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

Raquel de Oliveira Lo Turco

Márcia Cristina Furlaneto

Luciana Furlaneto-Maia

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos por meio do leite e derivados e carne suína, destaca-se o *Staphylo-*

coccus aureus, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares.

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

Não somente o leite e seus derivados podem trazer riscos à saúde quando consumidos com alta carga microbiana patogênica. Como qualquer produto de origem animal, a carne suína também pode servir de substrato para o desenvolvimento de vários microrganismos e vermes, como também pode ser vetor de intoxicações químicas, por resíduos de defensivos, de hormônios e aditivos intencionais. Todas as etapas do abate devem ser realizadas de forma higiênica e rápida, pois isso determina a qualidade microbiológica da matéria-prima.

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

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

Este trabalho teve como objetivo isolar *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos e verificar a variação do gene *coa*.

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

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

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

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

S. aureus possui vários fatores de virulência que contribuem para a sua persistência nos tecidos animais, como produção de toxinas extracelulares e enzimas (SANTOS et al., 2003). De acordo com Hamill et al. (1986), os *Staphylococcus* sp aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados por essas. O ambiente intracelular protege os *Staphylococcus* sp dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos dos antibióticos. Segundo Lee et al. (2004), esses fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana, contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente.

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

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

(FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Nunes (2000) afirma que os microrganismos resistentes não são um problema restrito ao ambiente hospitalar e que esses microrganismos estão disseminados também em qualquer ambiente.

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

Populações de *S. aureus* têm mostrado considerável variabilidade no conteúdo genômico. Essa variabilidade contribui para a emergência de distintos perfis epidemiológicos que são dependentes das cepas/isolados, o que sugere a necessidade de identificar esses subtipos antes de aplicar medidas específicas para controle dessa bactéria (FITZGERALD, et al. 2003; ZECCONI; PICCININI, 1999). Nos últimos anos, várias técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para identificar e comparar os subtipos de *S. aureus*. A amplificação do gene de coagulase (*coa*) tem sido considerada como um método simples e preciso para tipagem de *S. aureus* isolados a partir de fontes distintas. Os resultados da investigação epidemiológica com base na análise do gene *coa* sugerem que alguns subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação alimentar (SU et al., 1999; SCHLEGELOVÁ et al., 2003).

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

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

O leite é um meio de cultura ideal para os microrganismos em geral, por apresentar uma composição quase perfeita como alimento. Assim, a multiplicação dos microrganismos é muito rápida, se a temperatura for ideal para o crescimento (COUSINS; BRAMLEY, 1987). A contaminação microbiana do leite pode

ocorrer por duas vias principais: através da incorporação de microrganismos que estão presentes no úbere, diretamente para o leite; ou através do contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha ou da coleta e armazenamento (FEHLHABER; JANESTSCHKE, 1995).

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

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

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

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais, por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003).

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

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

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

2.2 Contaminação por *S. aureus* em embutidos

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

Antigamente, a produção era vista mais como uma arte do que realmente uma ciência. Porém, com a importância econômica e crescimento da sua industrialização, tornou-se necessário um maior entendimento dos princípios envolvidos na elaboração desses produtos (OLIVO, 2006). No Brasil, os embutidos crus produzidos a partir de carnes bovina, suína e de aves ainda carecem de padrões de identidade, com grande heterogeneidade na qualidade do produto final no que se refere à apresentação do produto, composição e valor nutricional (FERRÃO; SANTOS; VERSIANI, 1999).

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

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

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

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

Um importante agente de contaminação dos alimentos é o manipulador, pois na pele pode existir uma microbiota potencialmente patogênica. A maioria dos casos de toxinfecções alimentares ocorre através de manipuladores, que comprometem os alimentos por hábitos ou práticas inadequadas de higiene. Dentre os principais patógenos veiculados por indivíduos doentes ou portadores está o *Staphylococcus aureus* (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989).

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

2.3 Reação em cadeia da polimerase

Em 1985, Kary Mullis inventou a PCR (*polymerase chain reaction*, em português, reação em cadeia da polimerase), técnica que permite recriar grande quantidade de um gene a partir de uma parte ínfima de DNA (WERB, 1999). Essa técnica impulsionou drasticamente o ritmo da pesquisa genética. Em questão de algumas horas, a PCR pode fazer bilhões de cópias de um segmento específico do DNA. Kary Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993 por inventar a PCR.

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

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

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

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 Isolamento de *S. aureus*

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

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

A partir disso, foram realizados testes bioquímicos de identificação, como teste de DNase e teste de coagulase. Para o teste de DNase, colônias foram semeadas em placas contendo ágar DNase e incubadas a 37 °C. Após esse período, foi observada a formação de um halo esbranquiçado ao redor da colônia. Já o teste de coagulase foi realizado transferindo 0,2 ml de cada cultura obtida em caldo BHI para membrana de microscopia, com adição de 0,5 ml de plasma de coelho. Após homogeneização lenta, a mistura foi incubada a 37 °C, e a formação de coágulo foi verificada após quatro horas.

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

3.2 Teste de difusão em discos

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos à avaliação frente a antimicrobianos, utilizando protocolo recomendado pelo NCCLS (2000). Três a cinco co-

lônias puras recentes (18 a 24 horas) dos espécimes previamente isolados e identificados foram semeados em caldo MH (Mueller-Hinton) e incubados a 37 °C até que atingisse turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Esses espécimes foram semeados com auxílio de suabes na superfície de ágar MH e, após absorção, foram adicionados os discos dos antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e os diâmetros de inibição foram medidos e avaliados em tabela de sensibilidade.

3.3 Extração de DNA de *Staphylococcus* sp

Os DNA genômicos dos isolados foram extraídos utilizando-se a técnica da lise térmica, realizada de acordo com o protocolo descrito por Zocche et al. (2009). Com auxílio de uma alça, transferiu-se uma colônia para caldo BHI seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Dois mililitros da cultura foram transferidos para tubo Eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas com água destilada estéril a 10.000 xg por 10 minutos. A lise celular ocorreu pela adição de 100 µL de tampão de lise celular Tris-EDTA (50 mM Tris base e 20 mM de EDTA, pH 7,8) contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 3 µL de proteinase K (20 mg/ml⁻¹), e incubado em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução NaCl 5 M e foi feita a agitação manualmente por 15 segundos.

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

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

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

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

segundos, de 52 °C por 30 segundos, de 72 °C por 1 minuto, e, por fim, de 72 °C por 10 minutos.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

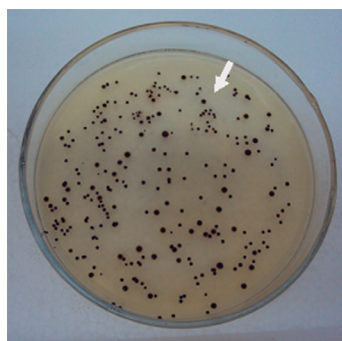
De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, 100% dos isolados obtidos neste estudo foram identificados como *S. aureus*. As contagens revelaram valores médios de $1,2 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^7$ UFC/g para embutidos e queijos, respectivamente (Quadro 11.1). A Fotografia 11.1 apresenta o meio de cultivo BP com as colônias características de *S. aureus*.

Quadro 11.1 Quantificação de *S. aureus* presente nas amostras de embutidos e queijo Minas frescal

Amostra	UFC/g ⁻¹ mínimo	UFC/g ⁻¹ máximo	Média de UFC/g ⁻¹
Embutido	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Queijo	$1,07 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$

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

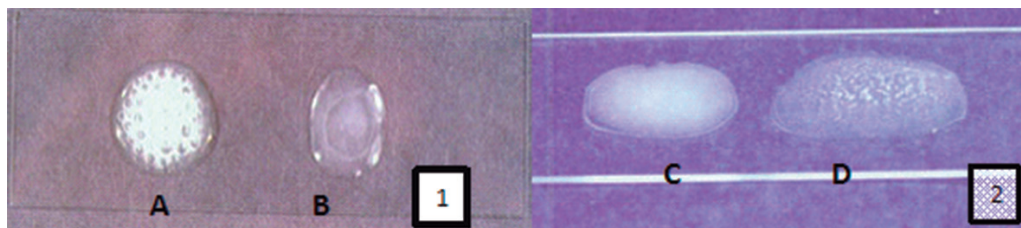
Na Fotografia 11.1, observam-se colônias características de *S. aureus* em ágar Baird Parker.



Fonte: Autoria própria.

Fotografia 11.1 Colônias características de *S. aureus* em ágar Baird Parker. Notam-se colônias negras com halos translúcidos ao seu redor (seta)

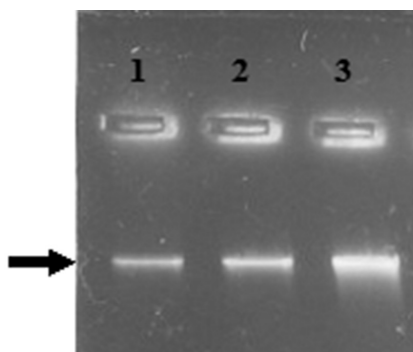
A Figura 11.1 apresenta dois testes bioquímicos característicos para a identificação de *S. aureus*.



Fonte: <<http://faculty.mc3.edu/jearl/ML/ml-10.htm>>.

Figura 11.1 Em 1: teste catalase positiva (A) e negativa (B); em 2: teste coagulase negativa (C) e positiva (D), característicos de *S. aureus* (A) e (D)

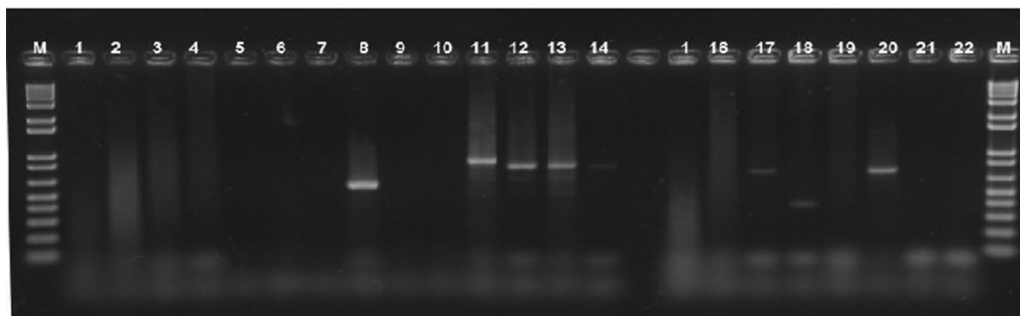
A Fotografia 11.2 apresenta a quantificação e integridade do DNA genômico após a extração em gel de eletroforese em agarose. Observam-se bandas íntegras e sem degradação, o que facilitou sua utilização na técnica PCR.



Fonte: Autoria própria.

Fotografia 11.2 Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, representando três isolados de *S. aureus*; as canaletas 1, 2 e 3 mostram bandas nítidas de DNA genômico (seta)

Para o teste de PCR, a fim de confirmar a espécie pela amplificação do gene *coa*, foram selecionadas vinte colônias que apresentaram os testes bioquímicos característicos para *S. aureus*. Contudo, nem todas apresentaram amplificação para o gene *coa*. Embora os testes bioquímicos de identificação tenham se apresentado característicos para a espécie, a identificação pela PCR do gene para coagulase não corroborou com esses resultados (Fotografia 11.3). O teste fenotípico da coagulase apresenta algumas restrições em sua aplicação, e a leitura dos resultados também dificultou a identificação da coagulação; a proteína pode, ainda, não estar sendo expressa nas condições de crescimento aplicadas neste trabalho.



Fonte: Autoria própria.

Fotografia 11.3 Gel de agarose com os amplicons para identificação do gene *coa*. Canaletas M: marcador de peso molecular (1 KB DNA plus); canaletas 1 a 22: colônias provenientes de amostras de embutidos e queijo tipo Minas frescal; canaletas 8, 11, 12, 13, 14, 17, 18 e 20 apresentam amplificação para o gene *coa*

Os *primers* *coag2* e *coag3* (mesma sequência utilizada nesta pesquisa) são específicos para esse microrganismo, pois não houve amplificação quando DNA de outras espécies em pesquisa realizada por Gandra (2008). Esse fato corrobora os resultados obtidos neste trabalho e os que apresentaram amplificação refere-se ao gênero *S. aureus*, podendo substituir a confirmação por testes bioquímicos. Os isolados que não apresentaram amplificação possivelmente não sejam estafilococos coagulase positiva, caso em que o teste de coagulase deu um falso positivo, ou se trata das demais espécies de estafilococos coagulase positiva (*S. hyicus* e *S. intermedius*). Como o gene *coa* apresenta polimorfismo entre as espécies de *S. aureus*, não há uma posição específica de bandas.

O número de pares de bases (pb) para gene *coa* variaram de 612 a 1000 pb. Essa variabilidade pode ser decorrente da variabilidade genética da enzima coagulase, demonstrada a existência de polimorfismo (GANDRA, 2008).

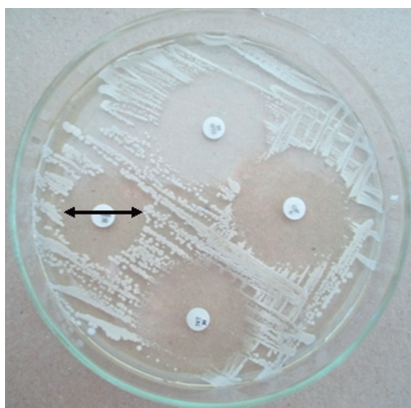
O perfil encontrado foi o mesmo demonstrado por Luz (2008), que detectou a presença de dois coagulotipos, de 750 pb e 1000 pb, em *S. aureus* isolados de leite e queijo coalho. Houve a distribuição e predominância dos coagulotipos de acordo com a região onde foram isolados (diferentes municípios).

Ressalta-se que estafilococos produtores de enzimas coagulase e termonuclease geralmente estão relacionados com a produção de enterotoxinas (GANDRA, 2008), uma preocupação atual. Nesse sentido, o diagnóstico molecular via PCR apresenta diversas vantagens em relação às técnicas da microbiologia clássica, sendo de fácil aprendizagem (simplicidade), menos tempo para adquirir as competências, menor custo de materiais, detecção de células VNC (viáveis não cultiváveis), maior especificidade, maior sensibilidade, bom limite de detecção e maior rapidez (FORSYTHE, 2002).

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

Diversos são os antimicrobianos preconizados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI 2009) para a realização do teste de disco difusão para *S. aureus*. Para sua realização, existe a necessidade de protocolos, padronizações e, particularmente, medidas do diâmetro de inibição. Neste estudo, foram avaliados doze antibióticos de uso clínico para *S. aureus*.

A Fotografia 11.4 apresenta a formação de halos de inibição ao redor dos discos contendo antibiótico (método disco difusão Kirby-Bauer).



Fonte: autoria própria.

Fotografia 11.4 Colônia típica de *S. aureus* inoculada em ágar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos. Seta indica halo de inibição causada pelo antibiótico

Os perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 21 cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas encontram-se na Tabela 11.1. O perfil de resistência em ordem decrescente ficou distribuído da seguinte forma: 76% das cepas foram resistentes à penicilina; 42%, à tetraciclina; 38%, à eritromicina; 33%, a estreptomicina e ácido nalidíxico; 23%, a teicoplanina, ciprofloxacina e vancomicina; 19%, a norfloxacina, gentamicina e cloranfenicol; e apenas 14%, a imipenem.

A maioria dos isolados de *S. aureus* foi suscetível ao imipenem (76%), e apenas três cepas (14%) dos isolados foram resistentes. Por outro lado, os resultados do antibiótico penicilina demonstram este ser o de menor eficiência contra o crescimento e evolução de cepas estafilocócicas. Dos isolados analisados, 61% apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos, demonstrando, assim, serem multirresistentes (Quadro 11.2).

Tabela 11.1 Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas em queijos e embutidos

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)
Teicoplanina	23	77
Norfloxacin	19	81
Penicilina	76	24
Imipenem	14	86
Streptomicina	33	67
Eritromicina	38	62
Gentamicina	19	81
Cloranfenicol	19	81
Ciprofloxacina	23	77
Ácido nalidíxico	33	67
Vancomicina	23	77
Tetraciclina	42	58

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

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

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

Quadro 11.2 Perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* a partir de alimento, frente aos antibióticos de uso clínico

Antibiótico/amostra	9E(13)	11E(4)	11E(9)	12E(1)	12E(2)	12E(5)	Q27(3)	15E(3)	Q29(6)	16E(12)	17E(2)	Q31(22)	FR02(2)	Q34(5)	Q35(1)	Q35(5)	Q36(8)	Q40(1)	Q40(14)	FR03(2)	FR03(10)
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Norfloxacin	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Estreptomomicina	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
Eritromicina	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Cloranfenicol	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Ciprofloxacina	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Ácido nalidixico	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R

R: resistência; S: sensibilidade.

O queijo Minas frescal, por ter um preço acessível e ser de fácil fabricação, é um produto amplamente consumido em diversas regiões do Brasil (SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1998). A pecuária de leite, associada à fabricação artesanal de queijos com venda direta ao consumidor em feiras livres, é comum em diversas regiões do país. Entretanto, na maioria das vezes, esses produtos são elaborados a partir de leite sem qualquer tratamento térmico, com condições higiênico-sanitárias duvidosas, o que leva à produção de um derivado de qualidade inferior, senão potencialmente capaz de comprometer a saúde de seus consumidores (SILVA, 1998).

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

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

5 CONCLUSÃO

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

Os problemas encontrados podem ser minimizados com auxílio de controle regular de qualidade, análise dos pontos críticos e programas de educação sanitária, como a implantação ou melhoria de BPF (boas práticas de fabricação) e POP (procedimentos operacionais padrão), tanto por parte dos produtores como pelos órgãos competentes.

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

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microbiology Drug Resistance**, Larchmont, v. 1, n. 3, p. 255-257, 1995.
- ALMEIDA FILHO, E. S. **Características microbiológicas do queijo Minas “frescal”, produzido artesanalmente e comercializado no Município de Poços de Caldas/MG.** [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal da UNESP, 1999.
- ANUÁRIO MILKBIZZ. **Anuário Milkbizz 1999/2000.** São Paulo: Milkbizz, 1999.
- ARAÚJO, F. D. S. et al. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 585-592, 2012.
- BARROS, P. C. O. G. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 32-37, jul. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução-RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES >. Acesso em: 16 ago. 2011.
- _____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, set. 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2013.
- CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: approved Standard.** 9. ed. Wayne, 2009.
- COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. Microbiologia de la leche cruda. In: ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactológica.** Zaragoza: Acribia, 1987. p. 109-150.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene veterinária de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1995. 669 p.
- FEITOSA, F. L. F. et al. Concentração de imunoglobulinas G e M no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa até os 90 dias de idade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, sup. 1, p. 26-31, 2003.
- FERRÃO, S. P. B.; SANTOS, W. L. M.; VERSIANI, C. V. Determinação de nitritos em linguiças frescas comercializadas em Belo Horizonte – MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, abr./mai. 1999.

- FITZGERALD, J. R. et al. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. **Infect Immun.**, v. 71, p. 2827-2838, 2003.
- FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, Sao Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt.
- GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GHARIB, A. A.; ATTIA, A. M. A.; BENDARY, M. M. Detection of the Coa Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 1, p. 37-42, 2013.
- HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **J. Food Protct.**, v. 52, p. 267-82, 1989.
- HAMILL, R. J.; VANN, J.M.; PROCTOR, R. A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: models for postadherence events in endovascular infections. **Infection Immunology**, v. 54, p. 833-836, 1986.
- JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994.
- KENNY, K. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 796-707, 1993.
- LEE, J. H. et al. Evaluation of the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, South korea, v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. **Microbiologia do queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, 2001.
- LU, P. et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 43, n. 1, p. 132-139, 2005.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4525-4529, 1992.
- LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

- MARTINS, S. C. S.; FELIX, P. R.; NASCIMENTO, G. G. F. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, Piracicaba, v. 12, n. 56, p. 45-48, 1998.
- MATTOS, E. C. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, mãos de manipuladores e veiculadas por formigas**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MATSUNAGA, T. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 55, p. 297-300, 1993.
- MILLEZI, A. F. et al. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanificante na indústria de alimentos. **Analytica**, n. 28, p. 74-79, p. 2007.
- NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. **Int. J. Food. Microbiol.**, n. 15, v. 98, p. 73-79, 2005.
- NUNES, E. L. C. **Deteção molecular do determinante genético da resistência a mupirocina em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- OLIVO, R.; MASSAMI, S. Emulsões Cárneas. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p. 123-133.
- OLSEN, J. E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, v. 3, p. 257-266, 2000.
- PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. v. 2. São Paulo: Editora Artmed, 2005.
- PEREIRA, M. S. V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 32-36, 2002.
- PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; TAKAKI, G. M. C. Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Peq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 1, p. 11-14, 2004.
- ROÇA, R. O., BONASSI, I. A. **Temas de tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, 1981.
- SABIONI, G. J.; HIROOKA, Y. E.; SOUZA, R. L. M. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-461, 1998.
- SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, Sao Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.
- SCHLEGELOVÁ, J. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p. 327-334, 2003.
- SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus sp.* isolado de queijos coalho comercializados em Recife/PE**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000. 75 f.

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

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

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

SU, C. et al. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. **Epidemiol. Infect.**, v. 122, p. 329-336, 1999.

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

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

VERSALOVICK, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

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

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

ZECCONI A.; PICCININI R. Teoria e prática de controle de mastite por *Staphylococcus aureus*. **Napgama**, v. 5, p. 4-11, 1999.

ZOCHE, F. et al. Multiplex PCR for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin in south of Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.