

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COLONIAIS SOB
INSPEÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA COMERCIALIZADOS EM PORTO
ALEGRE.**

THAIS DE CAMPOS AUSANI

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COLONIAIS SOB
INSPEÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA COMERCIALIZADOS EM PORTO
ALEGRE.**

Autora: Thais de Campos Ausani

**Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias, com
ênfase em Bacteriologia.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso**

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ausani, Thais de Campos

Qualidade microbiológica de queijos coloniais sob inspeção higiênico-sanitária comercializados em Porto Alegre / Thais de Campos Ausani. -- 2018.

178 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Queijos coloniais. 2. Staphylococcus aureus. 3. Listeria monocytogenes. 4. spa type. 5. resistência a antimicrobianos. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Título.

Thais de Campos Ausani

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COLONIAIS SOB
INSPEÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA COMERCIALIZADOS EM PORTO
ALEGRE.**

Aprovado em 28 de março de 2018.

APROVADO POR

Prof^ª. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Silvia Dias de Oliveira
Membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Andrea Troller Pinto

Membro da Comissão

Membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Verônica Schmidt

*Dedico a minha família, em especial ao
meu esposo, Maiquel, por todo apoio,
compreensão e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Marisa, pela generosidade e paciência, por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida. Obrigada por acreditar em mim.

Ao Professor Wladimir Padilha e a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas que me acolheram com muito carinho, em especial à Isabela Schneid Kroning que abandonou, temporariamente, seus estudos para me auxiliar nas pesquisas com enterotoxinas estafilocócicas.

Aos amigos, colegas e professores do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva pela amizade, companheirismo e ensinamentos. Aos queridos colegas e amigos do Lab. 3, Caroline, Vanessa, Cíntia, Claudia, Daniel, Graciela, Gabriela, Tatiana, Gustavo, Paola, Laura e Jordânia pelo companheirismo, apoio e amizade.

À Dona Berna, por todo carinho e dedicação.

À minha família pelo amor e carinho incondicionais.

Ao meu esposo, cuja parceria, apoio e compreensão, foram essenciais para realização desse sonho.

Obrigada a todos que contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

A produção de alimentos inócuos, aptos ao consumo humano, é de extrema importância tanto à saúde pública quanto para atividade econômica. O queijo colonial é tipicamente consumido pela população do Rio Grande do Sul, porém ainda há poucos dados sobre a qualidade microbiológica desse produto. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram: (i) avaliar a qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em feiras modelo e mercado público de Porto Alegre; (ii) caracterizar as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* presentes neste produto quanto a alguns fatores de patogenicidade, resistência e tipificação genotípica. Para tanto, no período de novembro de 2014 a maio de 2015, foram analisadas 205 amostras de queijo colonial inspecionado, compreendendo 17 marcas distintas comercializadas em feiras modelos e no Mercado Público de Porto Alegre. As análises microbiológicas evidenciaram que 47,31% dos queijos estavam não conformes com pelo menos um dos parâmetros microbiológicos estabelecidos na RDC nº12, portanto impróprios ao consumo humano. Com relação à quantificação de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, 10,73% e 40,48% das amostras apresentaram contagens superiores ao limite máximo estabelecido na legislação, respectivamente. Valores acima do padrão aceitável foram observados em 5,85% dos queijos amostrados para ambos os parâmetros. No que diz respeito à pesquisa de *Salmonella* sp., todas as amostras apresentaram-se em conformidade. *Listeria* sp. foi detectado em 12,19% dos queijos, dos quais 24% foram classificados como *L. monocytogenes*, 52% *L. innocua*, 16% *L. welshimeri/L. seeligeri* e 8% *L. grayi*. Em um dos queijos foi observado isolamento concomitante de *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Duas amostras apresentaram contagem de 3,6 NMP.g⁻¹ e 11 NMP.g⁻¹ de *Listeria* sp.; nos demais, a população encontrada foi < 3,0 NMP.g⁻¹. A sorotipificação de *L. monocytogenes* indicou a presença dos sorovares 1/2a, 1/2b e 1/2c e o perfil de PFGE demonstrou cinco pulsotipos. A partir da amplificação do gene *nuc*, 83 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foram confirmados como *S. aureus*. Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos todas as cepas foram suscetíveis a cefoxetina, oxacilina e vancomicina. Foram detectadas cepas resistentes a: penicilina (26,5%), todas confirmadas como produtoras de beta-lactamases; ciprofloxacina e eritromicina (9,63%); tetraciclina (7,22%) e gentamicina (4,81%). Do total de cepas, 66,26% foram suscetíveis a todos os antimicrobianos analisados enquanto 6,02% foram consideradas multi-resistentes. O gene *blaZ* esteve presente em 31,32% das cepas. Todas as cepas foram negativas para os genes *mecA* e *lukS-F*. Quanto à presença dos genes codificadores para SEs clássicas, 16,86% amplificaram algum gene sendo *sea* e *sec* os mais frequentes. A partir da tipificação molecular das 83 cepas de *S. aureus* foi possível detectar 19 *spa typing* diferentes entre as 11 marcas de queijos comercializados; os genótipos t127 e t002 foram predominantes. Foram detectados três diferentes tipos de sequências nas quatro cepas de *S. aureus* selecionadas para tipificação pela técnica de MLST realizada *in silico*: ST-133, ST-5 e ST-1. O queijo colonial comercializado em feiras modelo e no mercado público de Porto Alegre, foi confirmado como possível veiculador de microrganismos causadores de DTA. Entre esses patógenos, chama atenção a frequência de isolamento de *L. monocytogenes* e, principalmente, de *S.aureus*.

Palavras-chave: Queijo colonial, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, resistência, *spa type*.

ABSTRACT

The production of innocuous food, fit for human consumption, is of extreme importance to both public health and economic activity. Colonial cheese is typically consumed by the population of Rio Grande do Sul, but there is still limited data on the microbiological quality of this product. Thus, the objectives of the present study were: (i) to evaluate the microbiological quality of colonial cheeses marketed in model fairs and central market in Porto Alegre; (ii) to characterize Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes strains present in these products according to some pathogenicity and resistance factors as well as to their genotype. Thus, from November 2014 to May 2015, we analyzed 205 samples of colonial cheese, comprising 17 different brands marketed in model fairs and in the Public Market of Porto Alegre. Microbiological analyzes showed that 47.31% of the samples were not compliant with at least one of the microbiological parameters established in RDC nº12, therefore unfit for human consumption. Regarding the quantification of thermotolerant coliforms and Staphylococcus coagulase positive, 10.73% and 40.48% of the samples presented counts higher than the maximum limit established in the legislation, respectively. Values above the acceptable standard were observed in 5.85% of the samples for both parameters. With regard to Salmonella sp., all samples were negative. Listeria sp. was detected in 12.19% of the samples, of which 24% were classified as L. monocytogenes, 52% L. innocua, 16% L. welshimeri / L. seeligeri and 8% L. grayi. Concomitant isolation of L. monocytogenes and L. innocua species was observed in one sample. Two samples presented counts of 3.6 NMP.g-1 and 11 NMP.g-1 of Listeria sp.; in the others, the population found was <3.0 NMP.g-1. Serotyping of L. monocytogenes indicated the presence of serovars 1 / 2a, 1 / 2b and 1 / 2c and the PFGE profile showed five pulse types. The amplification of the nuc gene, confirmed the 83 isolates of Staphylococcus coagulase positive as S. aureus. Regarding the antimicrobial susceptibility profile, all strains were susceptible to cefoxetin, oxacillin and vancomycin. Strains resistant to: penicillin (26.5%) were detected, all of them confirmed as beta-lactamase producers; ciprofloxacin and erythromycin (9.63%); tetracycline (7.22%) and gentamicin (4.81%). Of the total strains, 66.26% were susceptible to all antimicrobials tested, while 6.02% were considered multiresistant. The gene blaZ was detected in 31.32% of the strains. All strains were negative for mecA and lukS-F genes. As for the presence of genes coding for classical SEs, 16.86% amplified some gene being sea and sec the most frequent. From the molecular typing of the 83 strains of S. aureus it was possible to detect 19 different spa types among the 11 brands of cheeses commercialized; the t127 and t002 genotypes were predominant. Three different types of sequences were detected in the four strains of S. aureus selected for typing by the MLST technique performed in silico: ST-133, ST-5 and ST-1. The colonial cheese marketed in model fairs and in the public market of Porto Alegre, was confirmed as a possible carrier of microorganisms that cause DTA. Among these pathogens, the frequency of isolation of L. monocytogenes and, especially, of S. aureus is noteworthy.

Keywords: colonial cheese, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, enterotoxins, resistance, spa type.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Características do queijo colonial	16
2.2	Qualidade microbiológica do queijo colonial	17
2.2.1	<i>Salmonella</i> sp.	20
2.2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.2.3	Coliformes termotolerantes	29
2.2.4	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	32
2.2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.2.4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> em alimentos	45
2.2.4.1.2	Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos agentes antimicrobianos.....	51
a)	Resistência aos β -lactâmicos.....	56
b)	Resistência aos glicopeptídeos.....	62
c)	Resistência aos aminoglicosídeos	64
d)	Resistência aos macrolídeos	65
e)	Resistência às fluoroquinolonas.....	67
f)	Resistência à tetraciclina	68
2.2.4.1.3	Epidemiologia molecular de <i>S. aureus</i>	70
3	MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1	Delineamento do estudo.....	74
3.2	Análises microbiológicas	77
3.2.1	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	77
3.2.2	Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	78
3.2.3	Quantificação de <i>Listeria</i> sp.....	78
3.2.4	Enumeração Coliformes termotolerantes	79
3.2.5	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	80
3.3	Identificação genotípica da espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	80

3.3.1	Extração de DNA	80
3.4	Determinação da CIM de antimicrobianos	81
3.5	Teste de detecção da produção de β -lactamase em <i>Staphylococcus</i>	84
3.6	Detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos.....	84
3.6.1	Pesquisa do gene <i>blaZ</i>	84
3.6.2	Resistência à meticilina.....	85
3.7	PCR para detecção do gene <i>lukS-F</i>	85
3.8	Tipificação molecular dos isolados de <i>S. aureus</i> pela técnica de <i>spa typing</i>	86
3.8.1	Amplificação da região repetida da proteína A do <i>S. aureus</i>	86
3.8.2	Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento do DNA	87
3.8.3	Análise das sequências	87
3.9	Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas	88
3.10	Sequenciamento genoma total.....	89
3.11	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	89
3.12	Genes de resistência – <i>ResFinder</i>	90
3.13	Análise de <i>Listeria monocytogenes</i> por macrorestrição (PFGE)	90
3.13.1	Suspensão Celular	90
3.13.2	Blocos de Agarose.....	90
3.13.3	Lise celular	91
3.13.4	Lavagens	91
3.13.5	Restrição DNA cromossomal.....	91
3.13.6	Eletroforese em campo pulsado	92
3.14	Análise estatística.....	92
4	RESULTADOS.....	93
4.1	Caracterização das amostras de queijo colonial.....	93
4.2	Qualidade microbiológica dos queijos colonial	94
4.3	Caracterização de <i>Listeria monocytogenes</i>	98
4.4	Caracterização de <i>Staphylococcus aureus</i>	101

5	DISCUSSÃO.....	111
6	CONCLUSÕES.....	129
	REFERÊNCIAS.....	130
	APÊNDICE A -.....	175

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento nutritivo que possui ampla aceitação pela população sendo consumido por pessoas de todos os níveis sociais e faixas etárias (SILVA *et al.*, 2011). Podendo ser fresco ou maturado, a sua produção é realizada através da coagulação natural do leite ou por meio de enzimas específicas (RODRIGUES *et al.*, 2011). Mundialmente são produzidos 18 bilhões de kg/ano de queijos, Estados Unidos é o maior produtor de queijos, produzindo cerca de 5 bilhões de quilos, a Alemanha o maior exportador, 603 milhões de quilos e, a Grécia o maior consumidor com 27,6 Kg habitante.ano⁻¹. No Brasil o queijo está entre os derivados lácteos mais consumidos no país, chegando a 5,4 kg habitante.ano⁻¹ (ABIQ, 2017). De acordo com Scartelli (2017), nos últimos anos ocorreu um aumento do consumo de queijo em lares de todas as faixas sociais, e um acréscimo da experimentação e consumo de produtos além dos tipos mais usuais: mussarela, requeijão e queijo prato. Projeções de mercado indicam aumento do consumo nos próximos anos, podendo chegar a 8 kg por habitante, em 2020.

Os queijos típicos são conhecidos por possuírem características específicas e por representarem a região na qual são produzidos. O queijo colonial, típico do Rio Grande do Sul, por exemplo, é produzido nesta região desde a colonização do Estado pelos imigrantes portugueses, italianos e alemães, sendo integrado aos hábitos alimentares e cultura gaúcha. Segundo Fernandez e Zanela (2009), os queijos ocupam lugar de destaque no consumo de derivados lácteos entre os consumidores porto alegrenses.

Apesar de muitos desses queijos ainda serem produzidos artesanalmente, em propriedades rurais, sem acompanhamento dos serviços de inspeção e políticas públicas, a produção industrial em queijarias fiscalizadas tem sido observada garantindo, assim, maior controle na qualidade sanitária desses produtos. No entanto, a ausência de regulamento técnico específico para o queijo colonial, produzido no Rio Grande do Sul, dificulta a análise do produto e padronização de qualidade, devido à diversidade na forma e ingredientes utilizados na sua produção.

A maioria das indústrias que produzem este queijo no Estado utilizam leite pasteurizado, acrescido de fermentos lácteos, coalho e cloreto de sódio, bem como a salga em salmoura, sendo o período de maturação realizado em câmaras frias por 20 dias, na maioria dos casos (GALVANI; AZEVEDO, 2013). Muito embora até o momento, não exista um regulamento técnico que especifique a qualidade e identidade

do queijo colonial para fins de determinação de padrões microbiológicos, o produto é considerado, pelos órgãos oficiais, como sendo de média umidade (<36% umidade > 46%) e semi gordo - entre 25 e 44,9% de matéria gorda no extrato seco (BRASIL, 1996). As mesmas características que contribuem para que o leite e seus derivados sejam considerados alimentos nutritivos, o fazem um excelente meio para o crescimento bacteriano, contribuindo para que estejam frequentemente associados a surtos e casos de intoxicação alimentar (BORGES *et al.*, 2008; LANGER *et al.*, 2012; MERUSSI; MAFFEI; CATANOZI, 2012; BRASIL, 2016). Dos derivados lácteos, associados a intoxicações alimentares, os queijos têm sido comumente relacionados a estes eventos (BORGES *et al.*, 2008).

Do ponto de vista de saúde pública, os alimentos ofertados ao consumo humano devem estar em conformidade com os padrões pré-estabelecidos, tanto em valores nutricionais quanto às condições higiênico-sanitárias adequadas em todas as etapas de fabricação, estocagem e comercialização do produto. Entre os patógenos que podem ser encontrados contaminando o leite e produtos lácteos, causando surtos ou casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), podemos citar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*.

As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis por milhares de hospitalizações e mortes todos os anos, sendo seu controle considerado um desafio para saúde pública em muitos países. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015) estima que mais de um terço da população mundial adoça por essas enfermidades todos os anos. No período compreendido entre 2007 e 2017, foram notificados mais de 7 mil surtos de DTAs no Brasil e mais de 120 mil pessoas adoeceram após a ingestão de alimentos contaminados sendo que, em 95,9% dos casos foram apontadas as bactérias como agentes etiológicos (BRASIL, 2017) e, em 2,8% dos casos, leites e derivados estiveram envolvidos (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Problemas com a qualidade e a segurança de alimentos existem há muitos séculos; alimentos contaminados causam um dos maiores problemas de saúde no mundo e geram uma redução na produtividade econômica (FORSYTHE, 2013). A inocuidade dos alimentos é uma preocupação crescente onde se consome, cada vez mais, alimentos industrializados ou prontos para o consumo em virtude do ritmo de vida acelerado e das mudanças nos hábitos do ser humano. Para tanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabeleceu como padrão microbiológico para queijos de média umidade, no qual se

enquadra os coloniais: ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*; e limites máximos de $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva e $1,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes.

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto constante de preocupação, dentre os microrganismos patogênicos que podem ser veiculados pelo queijo colonial destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. No que concerne à vigilância sanitária e inspeção de alimentos, as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo possuem relevância por estarem comumente envolvidos em DTAs, devido ao seu potencial enterotoxigênico, entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo apenas três (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas associadas a surtos de intoxicação alimentar (GANDRA, 2008; SANTANA *et al.*, 2010), apesar de *S.aureus* ser o mais relevante do grupo no que se refere à inocuidade dos alimentos. No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, *S. aureus* está envolvido em 5,8% dos casos de surtos alimentares (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Staphylococcus aureus é um patógeno ubíquo que está associado a várias doenças, tanto em humanos quanto em animais (ENRIGHT *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 2006; SIBBALT *et al.*, 2006; LOWDER *et al.*, 2009; QUINN *et al.*, 2011; PANTOSTI, 2012; PEACOCK; PATERSON, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016) aproximadamente 30% dos indivíduos saudáveis são portadores assintomáticos deste patógeno (De LEO, 2010; WENDLANDT *et al.*, 2013b). Esta espécie é capaz de produzir mais de 30 fatores de virulência, principalmente, proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas, (KROPEC *et al.*, 2005) que lhe permitem, além da invasão direta dos tecidos, a evasão do sistema imune, proliferação e sobrevivência no hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2007; OTTO, 2015); no entanto, a principal importância de *S. aureus* não está apenas relacionada ao fato de estar envolvido em infecções tanto em humanos quanto em animais mas, também, ao risco que esta espécie representa em saúde pública devido à capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis em alimentos (LAMAIA *et al.*, 2005; VIÇOSA *et al.*, 2010; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014) e veicular genes de resistência a antimicrobianos (RICH *et al.*, 2005; BEN SAID *et al.*, 2016).

A presença de cepas enterotoxigênicas e que carregam genes de resistência podem ser consideradas um problema de saúde pública, à medida que *S. aureus* pode ser um reservatório desses genes, propiciando a troca de informações genéticas entre

cepas patogênicas. Além disso, o fato de alimentos serem carreadores de bactérias resistentes chama atenção para o papel da cadeia alimentar na transmissão de microrganismos resistentes entre o ambiente e humanos (FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016).

São conhecidas duas rotas importantes de transferência de resistência aos antimicrobianos de animais aos seres humanos; uma direta, quando bactérias resistentes colonizando animais infectam os seres humanos e outra indireta, quando bactérias ou genes de resistência são transferidos horizontalmente à população bacteriana humana a partir da cadeia alimentar (LEENER *et al.*, 2005). Elementos genéticos móveis, em especial plasmídeos e transposons, desempenham papel importante como portadores de genes de resistência nos *Staphylococcus*, uma vez que os mesmos facilitam a transferência horizontal desses genes (WENDLANDT *et al.*, 2013a).

Em *Staphylococcus aureus*, a disseminação zoonótica de cepas resistentes à metilina, como a MRSA ST398 (DENIS *et al.*, 2009 WITTE *et al.*, 2007) tornou-se uma preocupação em saúde pública. Segundo Kadlec *et al.* (2012), o gênero *Staphylococcus* pode atuar como doador e receptor de genes de resistência que, na sua maioria, estão localizados em elementos genéticos móveis. Sua aquisição se dá a partir de um processo contínuo resultante da interação de *Staphylococcus* com os demais microrganismos. Segundo Wendlandt *et al.* (2013a), foram detectados mais de 40 diferentes genes de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* isolados em animais, conferindo resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos aprovados para utilização nestas espécies, tais como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, lincosamidas, fenicóis, aminoglicosídeos, pleuromutilinas e diaminopirimidinas.

A crescente disseminação de cepas resistentes é preocupante, pois as opções de tratamento de infecções graves causadas por estas bactérias podem tornar-se limitadas (HAGIHARA *et al.*, 2012). Enfatiza-se a importância do monitoramento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em alimentos, uma vez que, cepas resistentes podem se inserir na cadeia alimentar a partir de alimentos contaminados e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota normal ou potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal dos humanos (TEUBER, 1999; WITTE 2000).

A tipagem molecular de agentes patogênicos como *S. aureus* é importante por duas razões, a primeira é conhecer a micro-variação genética na cepa em nível de linhagem durante investigação de surto, útil para rastrear a origem e entender a transmissão do patógeno; a segunda é observar a macro-variação genética para estudos

filogenéticos e populacionais (NARUKAMA *et al.*, 2009; O'HARA *et al.*, 2016). Clones de *S. aureus* multirresistentes tem ampla distribuição e, nesse contexto, técnicas de biologia molecular (genotipagem) têm sido utilizadas como ferramentas na diferenciação de isolados com fenótipos idênticos. *Spa typing* é uma das técnicas utilizada na tipificação de *S. aureus*, este método consiste no sequenciamento de um único *locus* que determina as variações na sequência da região polimórfica X ou sequência de repetições curtas (SSR) do gene da proteína A (HARMSSEN *et al.*, 2003; AGIUS *et al.*, 2007; MEDIAVILLA *et al.*, 2012). A técnica tem demonstrado a sua utilidade para fins epidemiológicos como a investigação de surtos em vários níveis geográficos com vantagens em termos de rapidez, facilidade de uso, padronização e reprodutibilidade quando comparada com a técnica de MLST (MELLMANN *et al.*, 2006).

O gênero *Listeria* passou a ser considerado um patógeno veiculado por alimentos na década de 80 quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa; e *L. monocytogenes* foi implicada em várias formas de listeriose humana. (MCLAUCHLIN *et al.*, 2004). *Listeria monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende, principalmente, das condições imunológicas dos indivíduos afetados. A listeriose é uma infecção bacteriana severa de grande importância na saúde pública que acomete, principalmente, idosos e imunocomprometidos (BESSE *et al.*, 2005) com alta taxa de mortalidade (20% a 30% em populações de risco) e, apesar de ter menor frequência entre as DTA, a mesma apresenta alta letalidade (SCALLAN *et al.*, 2011). De acordo com Cruz *et al.* (2008), a listeriose é desconhecida por uma parte considerável da população no Brasil, embora possa ser a responsável pela maioria dos casos de morte decorrente de toxinfecções alimentares.

Apesar de diversas formas de transmissão do microrganismo em humanos já terem sido relatadas, a via alimentar parece ser a mais importante (ORSI *et al.*, 2011; LINKE *et al.*, 2014; EFSA, 2017), alimentos são apontados como causa de listeriose em 99% dos casos em humanos. Apesar de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* serem patogênicas para animais, apenas raros casos de infecção por *L. ivanovii* são relatados em humanos (HITCHINS *et al.*, 2002; CHAMBEL *et al.*, 2007). Assim, *L. monocytogenes* é a espécie investigada no âmbito da inocuidade dos alimentos. Entretanto, a presença de outras espécies de *Listeria* pode ser interpretada como indicativo de condições adequadas para a presença da espécie patogênica (ORSI *et al.*,

2011; LAMACO *et al.*, 2015), portanto seu isolamento pode ser considerado um risco no ambiente de laticínios e derivados lácteos.

Os queijos, entre os derivados lácteos são os que apresentam maiores ocorrências de contaminação por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e de média umidade, fatores como temperatura, atividade de água e pH nestes alimentos mostram ter impacto na virulência do agente (ANDERSEN *et al.*, 2007; DUODU *et al.*, 2010; WALECKA *et al.*, 2011; NIC AOGAIN & O'BYRNE, 2016). A presença dessa bactéria nesses queijos é preocupante porque são produtos que podem ser armazenados por períodos relativamente longos em refrigeração, o que permite a multiplicação do microrganismo, além de serem alimentos prontos para o consumo (BARANCELLI, 2011).

Diversos estudos têm evidenciado a qualidade microbiológica insatisfatória de queijos artesanais e a contaminação por microrganismos patogênicos em níveis que excedem os limites estabelecidos pela legislação, evidenciando o risco ao consumidor (ZAFFARI, MELLO E COSTA, 2007; ZEGARRA *et al.*, 2009; AMORIM *et al.*, 2014; VINHA *et al.*, 2016; CASARIL *et al.*, 2017) no entanto, a avaliação da qualidade microbiológica em queijo colonial sob inspeção oficial, assim como a caracterização das principais bactérias causadoras de DTAs nestas matrizes ainda são escassas.

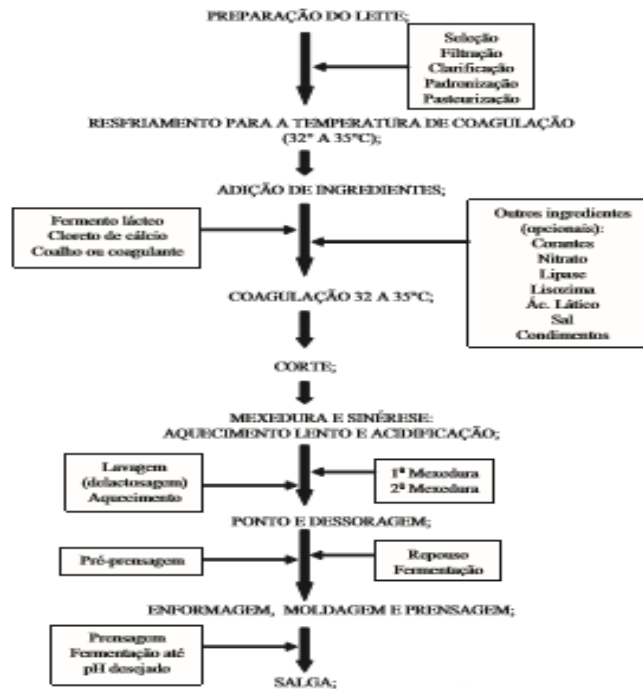
Considerando o exposto, os objetivos do presente estudo foram: (i) avaliar a qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Feiras Modelo e Mercado Público de Porto Alegre; (ii) verificar a presença de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* nestas matrizes e caracterizar estas bactérias causadoras de DTA quanto a fatores de patogenicidade, resistência e tipificação genotípica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do queijo colonial

O queijo colonial é um derivado lácteo tipicamente consumido no Rio Grande do Sul. Apesar de ainda não contar com regulamento técnico para estabelecimento de parâmetros de qualidade e identidade, usualmente, é fabricado com leite bovino pasteurizado, apresenta textura semi-dura, média umidade (umidade entre 36 e 45,9%), é semi gordo (entre 25 e 44,9% de matéria gorda no extrato seco) e tem período de maturação de 30 a 75 dias (DIPOA/RS). Schuh *et al.* (2016) observaram variações de pH em queijos coloniais sob inspeção oficial (SIF) entre 5,58 e 6,08. De acordo com memoriais descritivos (MD) de processo de fabricação, composição e rotulagem de produtos de origem animal (PRCR) utilizados para registro dos produtos no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), 96,97% dos queijos coloniais apresentam em sua composição leite pasteurizado, acrescido de fermentos lácteos, coalho e cloreto de sódio, enquanto que o uso de aditivos, como o urucum, foi observado em 15,2% dos registros. No processamento, a pasteurização rápida foi citada em 99,7% dos MD. Para a industrialização de derivados lácteos, aceitam-se a pasteurização rápida ou lenta, desde que o processo seja realizado em equipamentos cuja eficiência seja comprovada pelo Órgão Oficial Competente (RIO GRANDE DO SUL, 2006). A salga em salmoura é utilizada por 87,9% das empresas, sendo essa preparada na concentração de 20% para imersão dos queijos pelo período de 24 horas (GUSSO, 2009). A secagem não é mencionada em 57,6% dos registros, enquanto que a maturação é realizada, em câmaras frias, pelo período de 20 dias (54,5%). Os produtos, quando prontos, são acondicionados em embalagens de polietileno termo-encolhível (63,6%) identificadas por rótulos impressos (54,5%) e estocados em câmaras frigoríficas na temperatura de 0 a 8°C (60,6%). O peso descrito para a apresentação à venda oscila entre 0,2 a 5,0 Kg, com prazo de validade de 90 dias (57,6%). De acordo com Fox *et al.* (2000), o processo de fabricação de queijos engloba basicamente as etapas de preparação do leite, coagulação, corte, mexedura, dessoragem, enformagem, moldagem, prensagem, salga e maturação (Figura 1).

Figura 1 - Etapas básicas de fabricação do queijo



Fonte: adaptado de Fox *et al.* (2000)

2.2 Qualidade microbiológica do queijo colonial

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação microbiana dos alimentos é indesejável e, inclusive, nociva. Para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, que implicariam em contaminação do alimento, busca-se averiguar a presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos no alimento (SALOTTI *et al.*, 2006).

A produção de lácteos seguros baseia-se na implantação de sistemas de gestão da qualidade tais como: o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e seus pré-requisitos, que auxilia identificar, em qual etapa da produção, a maneira pela qual os patógenos chegam até o alimento, o que possibilita a redução das doenças de origem alimentar; as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que abordam as condições da área de procedência das matérias primas, condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos elaboradores de alimentos, requisitos de higiene (limpeza e sanitização) dos estabelecimentos, requisitos de higiene na manipulação dos alimentos, condições de armazenamento e transporte de matérias primas e produtos acabados; e os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) ou Procedimento Operacional Padrão (POP), onde se determina a segurança da água, as condições e higiene das

superfícies de contato com o alimento, prevenção contra a contaminação cruzada, higiene dos empregados, proteção contra contaminantes e adulterantes do alimento, identificação e estocagem adequadas de substâncias químicas e de agentes tóxicos, saúde dos empregados, controle integrado de pragas e registros (BRASIL, 1997; 1998). Os pré-requisitos do APPCC incluem as instalações, recebimento, armazenamento, equipamentos, programa de treinamento pessoal e o sistema de rastreabilidade (*recall*) (BRASIL, 1997; BRUM, 2004).

A implantação gradativa das BPF e do PPHO em estabelecimentos de leite e derivados é de grande importância e tem como objetivo estabelecer princípios que venham assegurar não só a segurança como também a qualidade dos alimentos elaborados, de forma que não ofereçam riscos à saúde do consumidor. Percebe-se que a elaboração do APPCC para indústrias de laticínios se faz necessária, uma vez que, durante o processo de produção de derivados lácteos, o produto fica susceptível às contaminações microbiológicas, por exigir em seu fluxo de produção uma grande manipulação, como ocorre durante a produção de queijo (FERREIRA *et al.*, 2011).

De acordo com Amorim *et al.* (2014), no que se refere aos queijos informais, eles não passam por controle de qualidade, não são inspecionados e geralmente são comercializados em feiras ou por ambulantes, sem os cuidados necessários na produção e conservação. Há uma série de problemas na qualidade dos queijos, constatando altos níveis de contaminação microbiana, geralmente atribuídas à manipulação excessiva, à falta de boas práticas, ao alto teor de umidade que favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e à forma de produção, que resultam na contaminação do produto. Santos & Hoffmann (2010) salientam a necessidade de garantir a segurança alimentar durante o processamento dos alimentos, adotando um sistema de controle de qualidade, como as BPF, utilizando-se de técnicas para a avaliação que podem ser classificadas em quantitativas, direcionadas à enumeração de bioindicadores de contaminação e qualitativas relacionadas à análise observacional por meio da aplicação de um formulário (*checklist*).

No processo de fabricação de queijos, o leite deve receber atenção especial da ordenha à pasteurização reduzindo desta forma o risco de contaminação do produto por bactérias patogênicas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A boa qualidade microbiológica do leite é fundamental na preparação do queijo. Ela pressupõe um gado saudável, boas práticas na ordenha e manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperatura entre 4°C e 7°C,

no máximo duas horas após a ordenha. Estas práticas permitem que o leite mantenha a sua qualidade microbiológica por até 72 horas, mas não significa ausência de bactérias, até mesmo porque o leite configura um ótimo meio de crescimento bacteriano (PERRY, 2004).

O recebimento do leite cru é um ponto crítico de controle etapas fundamentais incluem: o processo de pasteurização (70° a 72°C por 15 a 20 segundos ou 63°C a 65°C por 30 minutos) o qual é obstinado a eliminar patógenos naturalmente encontrados no leite; e o período de resfriamento (- 6°C, durante 1,5 horas) que previne a multiplicação bacteriana. As falhas mais comuns na elaboração do queijo incluem a falta de resfriamento ou resfriamento insuficiente da matéria prima, falhas no processo de pasteurização, contaminação pós-pasteurização, seja pelas más condições higiênico-sanitárias em equipamentos ou manipuladores em etapas posteriores da produção (adição de ingredientes, coagulação, mistura, enformagem, montagem, prensagem), falta ou período curto de maturação do produto (SILVA *et al.*, 2011; FORSYTHE, 2013). Outro ponto crucial para a garantia da qualidade do queijo é o armazenamento nos locais de venda, nos quais o mesmo deve ser mantido refrigerado em boas condições sanitárias, em locais limpos e sem presença de vetores a fim de se evitar a contaminação cruzada (PIETROWSKI *et al.*, 2008).

O controle de qualidade e as BPF em toda a cadeia de produção são de extrema importância para a elaboração de queijos coloniais, minimizando os níveis iniciais de contaminação, reduzindo a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patógenos ao longo do processamento e garantindo, assim, um produto final de qualidade, com a mínima contaminação microbiológica possível, dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (PINTO *et al.*, 2009; VISOTTO *et al.*, 2011). Além dos cuidados com a matéria prima, o controle de qualidade dos produtos acabados garante que sejam comercializados alimentos que estejam de acordo com os parâmetros legais vigentes (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Há parâmetros microbiológicos monitorados pelos órgãos de inspeção tanto no produto final quanto nos pontos de comercialização (MARTINS *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que características intrínsecas (principalmente pH e atividade de água) e extrínsecas (temperatura, umidade e atmosfera) desses queijos não impossibilitam a sobrevivência ou mesmo a multiplicação de microrganismos patogênicos tais como, *S. aureus*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*, bem como microrganismos deteriorantes, uma vez que, vários estudos em relação a qualidade

higiênico-sanitárias de queijos apontam altos índices de não-conformidades em relação aos padrões legais vigentes (FAVARO *et al.*, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 estabelece como padrão microbiológico para queijos “tipo colonial” ou queijos de média umidade a ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* e limites máximos de $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva e $1,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes.

2.2.1 *Salmonella* sp.

Salmonella sp. é um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo. No Brasil foi identificado como principal agente em surtos alimentares nos últimos dez anos (2007-2017) (BRASIL, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Salmonella* inclui bacilos Gram-negativos curtos (2-4 x 0,5-1 µm) não capsulados, anaeróbicos facultativos, a maioria é móvel em virtude de flagelos peritríquios e possuem habilidade para metabolizar nutrientes, catabolizando D-glicose ou outros carboidratos, com exceção de lactose e sacarose, com produção de ácido e gás (MARKEY *et al.*, 2013). Apresenta metabolismo tanto respiratório quanto fermentativo. Pertence à família *Enterobacteriaceae* e, como tal, apresenta reação negativa no teste da oxidase e positiva na prova da catalase. *Salmonella* apresenta capacidade de crescimento em temperaturas que variam de 7°C a 45°C e tolera faixas de pH variando entre 4,5 e 9,0. Contudo, seu crescimento ótimo se dá a 37°C e em pH entre 6,5 e 7,5 (HOLT, 1994). Pode se desenvolver em atividade de água (aw) de 0,93 a 0,99, com ótimo entre 0,94 e 0,99 (FORSYTHE, 2013).

Nas provas bioquímicas apresenta a capacidade de fermentar glicose, produzindo ácido e gás, porém não é capaz de metabolizar a lactose e a sacarose. É capaz de fermentar uma série de carboidratos como arabinose, maltose, manitol, manose, ramanose, sorbitol, trealose e xilose (QUINN *et al.*, 2011). É negativa para as provas de indol e Voges-Proskauer e positiva para o teste de Vermelho de Metila e Citrato de Simmons, não é capaz de hidrolisar uréia. Além disso, possui a capacidade de descarboxilar a lisina (HOLT, 1994).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo *S. enterica* subdividida em seis subespécies: *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*,

indica, *salamae* e *enterica*. Na classificação pelo esquema de Kauffmann e White, baseada na identificação dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), o gênero está dividido em mais de 2.500 sorovares. Através desta classificação, foi possível verificar que a maior parte dos sorovares de importância em saúde pública pertence à *S. enterica* sub. *enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007; FORSYTHE, 2013).

O habitat de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais de sangue quente e de sangue frio, os quais podem ser excretadores assintomáticos da bactéria. Trata-se de um microrganismo amplamente distribuído na natureza, capaz de sobreviver por longos períodos na presença de matéria orgânica e umidade (DE BUSSER *et al.*, 2013; FORSYTHE, 2013). A transmissão do patógeno ocorre pela via fecal-oral, também podendo ocorrer através das membranas mucosas das conjuntivas e pelo trato respiratório superior (MARKEY *et al.*, 2013). Alimentos de origem animal, são apontados como veículos de *Salmonella* sp., entre estes figuram carne, ovos e leite (WHO, 2015).

Nos humanos, a infecção por *Salmonella* pode se apresentar de três formas distintas, dependendo do sorovar envolvido. A infecção pelo sorovar adaptado *S. Typhi* resulta na febre tifoide. Quando o sorovar envolvido é *S. Paratyphi* ocorre a febre entérica. No caso de infecção por sorovares não adaptados, que constituem a maioria, há um quadro de gastroenterite. A febre tifoide está associada à ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes ou urina de seres humanos com doença clínica ou portadores assintomáticos (GONZALES-ESCOBEDO, 2010; CRAWFORD, 2010), sendo mais prevalente em regiões onde as condições de saneamento são precárias (SILVA JR., 2010; GONZALES-ESCOBEDO, 2010). Nesta enfermidade os primeiros sintomas geralmente aparecem entre sete e 28 dias após a infecção; e os indivíduos acometidos apresentam febre prolongada, cefaleia, inapetência, náusea, vômito, constipação, diarreia, entre outros sintomas, podendo levar o paciente a óbito (PARRY, 2002; GONZALES-ESCOBEDO, 2010; FORSYTHE, 2013). A febre entérica também resulta do consumo de água e alimentos contaminados como, por exemplo: leite, vegetais crus, mariscos e ovos. A sintomatologia é semelhante à febre tifoide, apesar de mais branda, mas alguns casos também podem evoluir para septicemia (SHINOHARA, 2008).

A gastroenterite associada aos sorovares não adaptados caracteriza-se pelo curso rápido, aparecendo os primeiros sintomas entre 12 e 36 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas mais frequentes incluem: dor abdominal, diarreia,

náuseas e mal estar. Esse quadro, geralmente, estende-se por 72 horas e tende a ser auto-limitante (PINTO, 2000). Entre os sorovares envolvidos nos casos de gastroenterite por *Salmonella*, o mais prevalente é *S. Enteritidis*, mas também são relatados casos envolvendo outros sorovares como Typhimurium, Derby, Panama, Schwarzengrund, Infantis, Agona, entre outros (FORSYTHE, 2013; CAPALONGA, 2014).

Os sorovares não adaptados de *Salmonella* são o patógeno mais implicado em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil, respondendo por cerca de 14,7 % dos casos de DTA registrados pelo sistema de vigilância sanitária (BRASIL, 2017). Estudos com voluntários revelaram que a dose infectante de diversos sorovares não-tifóides testados é de 10^5 a 10^{10} bactérias por grama de alimento (KOTHARY; BABU, 2001). Entretanto, alguns dados obtidos de surtos de salmonelose sugerem que a dose infectante pode ser tão baixa quanto 100 bactérias (D'AOUST *et al.*, 1975). A quantidade de bactérias por grama de alimento necessária para causar infecção varia com a cepa envolvida, o alimento consumido e o estado fisiológico e imunológico do hospedeiro. A legislação brasileira proíbe a presença de *Salmonella* em 25g ou mL de alimento (SHINOHARA, 2008).

Diversos alimentos podem ser responsáveis por veicular sorovares, não adaptados, de *Salmonella* em surtos de infecção alimentar. Entre eles, destacam-se ovos e produtos à base de ovos crus e produtos cárneos (SHINOHARA, 2008; FORSYTHE, 2013; BRASIL, 2015). No entanto, leite e derivados têm sido associados a surtos de salmonelose no Brasil e em vários países. O queijo minas frescal, coalho e colonial aparecem em inúmeros relatos de isolamento de *Salmonella* sp., devido, principalmente, à utilização de leite cru, manipulação, hábitos higiênicos deficientes ou pela pasteurização inadequada da matéria prima utilizada na fabricação do queijo (BORGES *et al.*, 2010).

Em países como França, Canadá, Dinamarca, Escócia, Estados Unidos, Holanda, Suécia, Inglaterra e País de Gales, de um total de 60 surtos estudados, *Salmonella* sp. foi responsável por 29 destes, sendo o principal patógeno associado a DTA. Leite e derivados estavam envolvidos em 1 a 5 % do total de surtos causados pela bactéria em questão (DE BUYSER *et al.*, 2001). No Brasil, leite e derivados foram implicados em 2,8% dos surtos de DTA entre 2007 e 2017, sendo que, neste mesmo período *Salmonella* foi a agente etiológico apontado em 515 surtos (ANVISA, 2017).

Antonello, Kupkovski e Bravo (2012), que avaliaram a qualidade microbiológica de quatro diferentes marcas de queijo colonial comercializadas em supermercados na

cidade de Francisco Beltrão, no Paraná, indicaram que 17,85% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* sp. Peresi *et al.* (2001) analisaram amostras de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, e identificaram *Salmonella* sp. em duas amostras produzidas artesanalmente. Assim como, Grandi e Rossi (2007), analisando queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, verificaram uma das vinte amostras analisadas com a presença de *Salmonella* sp., Castro *et al.* (2013), em estudo realizado em queijos mussarela observou presença de *Salmonella* sp. em 33,3% das amostras. Por outro lado, Yamaguchi *et al.* (2013) pesquisando *Salmonella* sp. em alimentos e ambientes, não detectaram positividade para *Salmonella* sp. entre as 227 amostras de queijo analisadas (mussarela, prato e minas frescal). Assim como Pinto *et al.* (2011), Lucas *et al.* (2012), Ribeiro *et al.* (2012), Melo *et al.* (2013), Leite Júnior *et al.* (2013), Apolinário *et al.* (2014), Amorin *et al.* (2014), não detectaram a presença de *Salmonella* sp. em amostras de queijo.

Segundo Andrade *et al.* (2006), a ausência de *Salmonella* sp. pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas que tornam o queijo um meio adverso à sobrevivência de microrganismos patogênicos, acidificando-o e desfavorecendo a multiplicação de microbiota indesejável (PINTO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2013). Além disso, as bactérias lácticas também podem produzir bacteriocinas que irão restringir a multiplicação de microrganismos contaminantes. A produção de queijos a partir de leite pasteurizado também assegura a qualidade do produto, devido à eliminação dos patógenos e redução de deteriorantes (PERRY, 2004).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende cocobacilos Gram-positivos curtos (0,4 - 0,5 µm de diâmetro e 0,5 - 2 µm de comprimento), catalase positiva, oxidase negativa, móveis, anaeróbicos facultativos, fermentadoras de glicose, que hidrolisam esculina (MARKEY *et al.*, 2013). O gênero *Listeria* é constituído por dezessete espécies distintas (ORSI & WIEDMANN, 2016) diferenciadas a partir de testes de fermentação de carboidratos e produção de hemólise em ágar sangue (QUINN *et al.*, 2011). São classificadas como psicotróficas, por possuírem capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (FORSYTHE, 2013). Dentre as espécies do gênero *Listeria*, duas já foram descritas como potencialmente patogênicas: *L. ivanovii*, com importância restrita a

ruminantes; e *L. monocytogenes*, capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais e os seres humanos (RYSER E MARTH, 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

Listeria monocytogenes possui capacidade de multiplicação em temperaturas entre 0 e 42°C; tolera pH entre 5,5 e 9,6; concentrações salinas de 10,5 a 30,5% (CRUZ *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FORSYTHE, 2013) e, em meios específicos apresenta motilidade característica com forma de “guarda chuva” quando encubada a 20-25°C, fermenta os carboidratos D-glucose, D-xilose, D-manitol e L-ramanose e, em ágar sangue apresenta teste CAMP-like positivo com *S. aureus* com hemólise com aspecto de “ponta de cotonete” (QUINN *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes tem sido isolada a partir de vários ambientes, incluindo vegetações em decomposição, solo, forragens, água, silagem, esgoto e fezes. Inclusive, pode ser encontrada como parte da microbiota gastrointestinal de animais e indivíduos saudáveis. A presença de *L. monocytogenes* nas instalações e equipamentos da indústria alimentícia é relativamente frequente, já que a mesma pode entrar na planta da indústria por inúmeras maneiras, como por exemplo, através das matérias primas. Uma vez que, a bactéria se encontra nas instalações alguns fatores determinam a sua capacidade de sobrevivência - fatores ambientais, capacidade de formar biofilme, tolerância e resistência aos desinfetantes e higienização precária, tornando-se assim um perigo na contaminação dos alimentos (KLANČNIK *et al.*, 2015, SCHOBITZ; CIAMPI; NAHUELQUIN, 2009). Além disto, possui a habilidade de sobreviver a condições de estresse comumente encontradas em alimentos, como alta concentração de sal, baixo pH e baixa temperatura (WARRINER & NAMVAR, 2009). Dessa forma, a temperatura utilizada para o armazenamento dos alimentos não impede a multiplicação do microrganismo e o leite e produtos lácteos, os quais são armazenados refrigerados, figuram entre os alimentos comumente envolvidos em surtos de listeriose.

Os alimentos frescos de origem animal podem apresentar quantidade variável deste microrganismo. Existem várias vias de acesso de *L. monocytogenes* na cadeia alimentar. Segundo Linke *et al.* (2014) a água e o solo configuram as principais fontes de contaminação por este microrganismo tanto no alimento quanto em animais. De acordo com Nightingale *et al.* (2005) o ambiente de trabalho – produção (fazenda), frequentemente contaminado com o microrganismo talvez seja a principal fonte de contaminação da matéria-prima. Já os alimentos “prontos para consumo” podem ser contaminados durante etapas de processamento e manuseio do produto pelo contato em

superfícies, equipamentos e trabalhadores infectados. Pradhan *et al.* (2011) citam que práticas de varejo podem resultar na contaminação cruzada do alimento assim como, o armazenamento do produto durante longos períodos sob refrigeração (REDMOND, 2016).

As bactérias do gênero *Listeria* são pouco competitivas sendo sua adaptação ao meio prejudicada pela presença de outros microrganismos, assim como das condições físico-químicas do alimento (ASPRIDOU *et al.*, 2014; MEJILHOM & DALGAARD, 2015). *Listeria monocytogenes* são mais tolerantes à baixa atividade de água, sendo capaz de multiplicar em alimentos que apresentam aw até 0,91 (FORSYTHE, 2013).

Os queijos, entre os derivados lácteos são os que apresentam maiores ocorrências de contaminação por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e de média umidade. A presença dessa bactéria nesses queijos é preocupante porque são produtos que podem ser armazenados por períodos relativamente longos em refrigeração, o que permite a multiplicação de *L. monocytogenes*, além de serem alimentos prontos para o consumo (BARANCELLI *et al.*, 2011).

O gênero *Listeria* passou a ser considerado um patógeno veiculado por alimentos na década de 80 quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa; e *L. monocytogenes* foi implicada em várias formas de listeriose humana. (MCLAUCHLIN *et al.*, 2004). *Listeria monocytogenes* já foi detectada em mais de 40 espécies de mamíferos e aves e, tanto humanos quanto animais podem desenvolver listeriose. É considerado um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados. É uma infecção bacteriana severa de grande importância na saúde pública, que acomete principalmente idosos e imunocomprometidos (BESSE *et al.*, 2005) com alta taxa de mortalidade (20% a 30% em populações de risco) e, apesar de ter menor frequência entre as DTA, a mesma apresenta alta letalidade (SCALLAN *et al.*, 2011).

A doença apresenta um período variável de incubação (3 a 70 dias), o que dificulta a identificação do agente causador e a origem da contaminação do alimento (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003). De acordo com Cruz *et al.* (2008) a listeriose é desconhecida por uma parte considerável da população no Brasil, embora possa ser a responsável pela maioria dos casos de morte decorrente de toxinfecções alimentares. Após a ingestão e passagem do microrganismo pelo trato-digestório e multiplicação no lúmen intestinal, ocorre a invasão da mucosa, atinge a circulação sanguínea e linfática. Os sítios de maior multiplicação são fígado e baço,

podendo atravessar a barreira cefalo-raquidiana e placentária e causar encefalite e aborto (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A listeriose apresenta-se sob três formas: gastroenterite febril, listeriose materno-fetal/neonatal ou bacteremia com ou sem acometimento do sistema nervoso central (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Na sua forma invasiva, a listeriose é severa e acomete pessoas em grupo de risco como os imunocomprometidos, idosos, mulheres grávidas e neonatos (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Em gestantes, a infecção apresenta sintomas de gripe, febre e dor de cabeça, sendo as complicações mais comuns o aborto espontâneo ou natimorto. Em casos de gastroenterite os sintomas são: diarreia, febre, dor de cabeça, mialgias e dor abdominal. Os pacientes afetados geralmente são indivíduos saudáveis e o período de incubação em média é 24 horas; em geral esse paciente não necessita ser submetido à antibioticoterapia. Em recém-nascidos existem duas formas de listeriose: a precoce e a tardia. A tardia ocorre após duas semanas de vida e está associada com meningites; enquanto que a precoce está associada com sintomas respiratórios e bacteremia. A listeriose é reconhecida como uma das duas principais causas de meningite em recém-nascidos (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; LAMONT *et al.*, 2011). A maioria das infecções em adultos ocorre em pacientes com mais de 50 anos de idade e causa meningite, meningoencefalite, tromboencefalite e abscessos no cérebro devido ao tropismo da bactéria pelo sistema nervoso central (DISSON & LECUIT, 2012). Segundo ORSI; BAKKER; WIEDMANN (2011) e Lamaco *et al.* (2015) apesar de *L. monocytogenes* ser considerada a única espécie patogênica ao homem, a detecção das demais espécies no alimento serve de alerta para possibilidade da presença da bactéria, considerada pior competidora que as demais espécies do gênero nos meios de cultivo de isolamento. Segundo Chambel *et al.* (2007), existem relatos de infecções ocasionais por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii*.

Listeria monocytogenes está subdividida em sorotipos com base nos antígenos somáticos e flagelares. Treze sorovares já foram identificados: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7; (DOUMITH *et al.*, 2004; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007); dentre os quais, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os principais responsáveis por casos de listeriose em humanos (DA SILVA *et al.*, 2011; BARANCELLI *et al.*, 2011; ORSI; BAKKER; WIEDMANN, 2011; LOMONACO *et al.*, 2015). Pesquisa realizada no período compreendido entre 1969 e 2000 revelou que o sorotipo 4b é o mais frequente (BORUCKI *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2011). Visto

isso, duas hipóteses poderiam explicar a predominância desses sorotipos: (1) geralmente os humanos são mais expostos a esses sorotipos de *L. monocytogenes*; e (2) esses são os sorotipos que possuem potencial patogênico para o homem (WIEDMANN *et al.*, 2002). Os sorotipos 4b e 1/2b são bons formadores de biofilme (DJORDJEVIC *et al.*, 2002; CHAE *et al.*, 2006), apresentando impacto negativo para a indústria de laticínios bem como no contexto de saúde pública.

Este patógeno é agrupado em quatro linhagens com base em sua ribotipagem e associação com surtos (Tabela 1). A linhagem I tem o maior potencial patogênico e os sorotipos pertencentes a este grupo estão mais envolvidos em surtos. A linhagem II tem potencial patogênico intermediário e, é possivelmente, responsável por surtos esporádicos, enquanto as linhagens III e IV apresentam baixa patogenicidade e raramente causam infecção em humanos (BHUNIA, 2008; ORSI; BAKKER; WIEDMANN 2011).

Tabela 1 - Linhagens de *L. monocytogenes*

Linhagem	Sorotipos	Características	Distribuição
I	1/2b, 3b, 3c, 4b	Menor diversidade e níveis de recombinação entre as linhagens	Encontrado em várias fontes sobretudo isolados de humanos
II	1/2a, 1/2c, 3a	Maior diversidade e baixo nível de recombinação entre as linhagens	Encontrado em várias fontes sobretudo isolados de alimentos e ambiente
III	4a, 4b atípico e 4 c	Níveis de recombinação entre as linhagens I e II	A maioria dos isolados obtidos a partir de ruminantes
IV	4a, 4b atípico e 4 c	Poucos isolados identificados até o momento	A maioria dos isolados obtidos a partir de ruminantes

Fonte adaptado de ORSI; BAKKER; WIEDMANN, 2011.

Embora a dose infectante necessária para provocar listeriose ainda não tenha sido estabelecida, acredita-se que a mesma possa variar conforme a cepa/linhagem e a susceptibilidade do indivíduo. Segundo relatórios do EFSA e ECDC (2015) deve-se adotar como critérios microbiológicos a ausência em 25g do produto, para população de risco e, ≤ 100 UFC/g de produto para indivíduos saudáveis. Informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que, em geral, populações entre 10^3 e 10^4 UFC/g sejam responsáveis pela doença. Em casos contraídos através de leite pasteurizado ou cru afirma-se que em pessoas suscetíveis, menos de 1.000 organismos possam causar listeriose (FORSYTHE,

2013). Entretanto, em um surto ocorrido na Finlândia foi verificado que a exposição da população de risco a doses baixas de *L. monocytogenes* ($0,3 \text{ NMP.g}^{-1}$), por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (MAYALA *et al.*, 2001).

No Brasil, a listeriose humana não é enfermidade de notificação obrigatória e, além de subdiagnosticada, provavelmente, é também subnotificada (BARANCELLI *et al.*, 2011). Nenhum caso de listeriose, como surto de DTA, foi relatado no país no período de 2007 a 2017, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), mesmo que *L. monocytogenes* já tenha sido encontrada em produtos cárneos, lácteos e vegetais (BORGES *et al.*, 2009; LECLERCQ *et al.*, 2010; BARANCELLI *et al.*, 2011). Segundo EFSA (2017) 99% dos casos de listeriose em humanos são de origem alimentar. A ocorrência de infecções humanas por *L. monocytogenes* está associada na maioria das vezes com leite e derivados, sendo os queijos frescos e o leite cru os mais frequentemente contaminados (BORGES *et al.*, 2009; RAHIMI *et al.*, 2010; JAMALI *et al.*, 2013).

A frequência de isolamentos de *L. monocytogenes* é muito variável. No Brasil, Langoni & Fonseca (1997) obtiveram 7% de positividade para *L. monocytogenes* em amostras de leite cru oriundas de casos de mastite subclínica e clínica. Sousa *et al.* (2006) relataram que dentre 70 amostras de queijo coalho, 17% apresentavam o patógeno. Da Silva *et al.* (2011) analisando diferentes tipos de queijos no país, encontraram o agente variando de 0 a 48,3%, no período compreendido entre 2000 e 2009, com predomínio em queijo minas frescal. Schwab *et al.* (1996), no Rio Grande do Sul, conseguiram isolar *L. monocytogenes* e *L. innocua* de amostras de queijos coloniais comercializados em Porto Alegre. Por outro lado, muitos pesquisadores não isolaram esse patógeno em leite cru ou em produtos lácteos (PADILHA *et al.*, 2001; NERO *et al.*, 2004; ARCURI *et al.*, 2006; CAMARGO, 2010; TAMANINI *et al.*, 2012).

Mundialmente, *L. monocytogenes* tem sido relatada com frequência em alimentos (OSAILI *et al.*, 2011; FALLAN *et al.*, 2012; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Dentre os patógenos de origem alimentar, *L. monocytogenes* é responsável pela mais elevada taxa de internação hospitalar (90%), além de apresentar alta taxa de letalidade (20 a 30%) (ZHANG *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, *L. monocytogenes* está entre os 31 principais patógenos que causam 9,4 milhões de casos de DTAs anualmente (SCALLAN *et al.*, 2011), estima-se que pelo menos 500 óbitos registrados anualmente são ocasionados pela listeriose (WILLIAMS *et al.*, 2011). O

CDC notificou entre 2009 e 2011, 292 mortes e perdas fetais por listeriose em 38 estados dos EUA. Em setembro de 2012 ocorreu um surto de listeriose provocado por queijo contaminado com *L. monocytogenes* em 11 diferentes estados dos EUA com 14 pessoas infectadas contabilizando três mortes (WONG, 2013), reforçando a importância desse patógeno na saúde pública.

Na Etiópia, Derra *et al.* (2013) detectaram 3,42% de amostras de leite cru positivas para *L. monocytogenes*. Da mesma forma, Karthikeyan *et al.* (2015) obtiveram 15 isolados de *L. monocytogenes* entre 307 amostras de leite e produtos lácteos avaliados. Independentemente da origem do patógeno deve-se destacar a importância de *L. monocytogenes* para a indústria de laticínios bem como para a saúde pública. A Índia também apresenta histórico de registros de *L. monocytogenes* no leite cru e em estabelecimentos de processamento de leite, com prevalências que variam entre 5,1% e 8,57% de amostras positivas (BHILEGAONKAR *et al.*, 1997; BARBUDDHE *et al.*, 2002; KALOREY *et al.*, 2008; DOJAD *et al.*, 2011). Da mesma forma, na Espanha, Gaya *et al.* (1998) analisando 774 amostras de leite, encontraram 3,6% de positividade para *L. monocytogenes*. Entre 2009 e 2012, registraram-se sete episódios de listeriose por ano na população do país Basco, no norte da Espanha; e entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2014, ocorreram 27 episódios de listeriose nessa mesma região (PÉREZ-TRALLERO *et al.*, 2014). Os registros de surtos e casos de listeriose na União Europeia (UE) são alarmantes e o leite e produtos lácteos estavam envolvidos em 50% dos casos, afetando em especial a população de idosos (53% dos casos), demonstrando a importância epidemiológica do leite na transmissão, pois ocorreram muitos casos da forma clínica grave da enfermidade (SANAA *et al.*, 2004; TODD; NOTERMAN, 2011). Na Europa, houve aumento do número de casos, 1.645 confirmados em 2009, e taxa de letalidade de 16,6% (EFSA, 2009). Na França, entre 1999 e 2005, foram registrados de 3,5 a 4,5 casos/1 milhão de pessoas e somente no ano de 2006, 4,7 casos/1 milhão de pessoas (GOULET *et al.*, 2008). Em 2006, a UE registrou surto de *L. monocytogenes* envolvendo pelo menos seis pessoas na Alemanha, pelo consumo de queijo tipo Hartz contaminado (TODD; NOTERMAN, 2011). No Irã, Jamali *et al.* (2013) examinaram 446 amostras de leite cru oriundas de bovinos, caprinos e ovinos, das quais 21,7% estavam contaminadas com *L. monocytogenes*.

2.2.3 Coliformes termotolerantes

O grupo dos coliformes termotolerantes é constituído por bactérias Gram-negativas, em forma de bacilos (0,3 -1 µm x 0,6 – 6 µ), oxidase-negativas, catalase positivas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, caracterizadas pela atividade da enzima β-galactosidase que crescem em meios contendo agentes tenso-ativos e que fermentam a lactose nas temperaturas de 44° - 45°C, com produção de ácido, gás e aldeído (JAY, 2005; SILVA *et al*, 2001; FENG *et al.*, 2011). Fazem parte deste grupo os gêneros *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Klebsiella* sp., comumente encontrados no solo, vegetação e nas fezes, com exceção da *E. coli*, presente apenas no trato intestinal do homem e animais homeotérmicos (MENESES *et al.* 2012; BELOTI *et al.*, 2015).

Os coliformes termotolerantes além de utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos são também empregados como indicadores de falhas higiênico-sanitárias dos processos de fabricação (BRASIL, 2001; SILVA *et al*, 2010; OLANARIN *et al.*, 2011). Entre as bactérias do grupo coliformes, *E. coli*, é a espécie que melhor indica poluição fecal e a possível presença de patógenos entéricos nos alimentos (BARANCELLI *et al.*, 2011; FORSYTHE, 2013).

A maioria das cepas de *E. coli* são comensais (OLSEN *et al.*, 2000; MIITELSTAED & CARVALHO, 2006; FENG *et al.*, 2011; TCHAPTCHET & HANSEN, 2011), todavia, diversos clones de *E.coli* foram adquirindo fatores de virulência que lhes permitiram adaptar-se a novos ambientes e, em alguns casos, causar doenças graves (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; FARROKH *et al.*. 2013). A classificação de *E. coli* é baseada em diferenças antigênicas (sorotipagem) e fatores de virulência. Em relação aos fatores de virulência e manifestações clínicas das linhagens de *E. coli* são consideradas patogênicas algumas classes, entre elas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterro-agregativa (EAEC), *E. coli* difusivamente aderente (DAEC) e *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; GUTH *et al.*, 2010; FARROKH *et al.*. 2013; CROXEN *et al.*, 2013).

Enquanto alguns tipos de *E. coli* causam diarreia, infecção urinárias, doenças respiratórias e pneumonia (MIITELSTAED & CARVALHO, 2006; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007) outras podem causar doenças graves transmitidas por alimentos como é o caso da EHCE produtoras de toxina Shiga (STEC) (MIITELSTAED & CARVALHO, 2006; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; FENG *et al.*2011). Cepas de STEC estão envolvidas em um amplo espectro de doenças e, de acordo com Farrokh *et*

al., (2013) no grupo das EHEC, *E. coli* O157:H7 além de ser o sorovar de maior importância é o mais estudado. A transmissão a humanos está associada ao consumo de alimentos contaminados, principalmente leite, carne e ovos crus ou mal cozidos, e também pelo consumo de vegetais crus. Outra possibilidade é a transmissão de pessoa a pessoa, pela via fecal-oral (MIITELSTAED & CARVALHO, 2006).

Escherichia coli foi reconhecida como patógeno de origem alimentar em 1971, quando queijos importados foram comercializados em quatorze estados americanos, provocando aproximadamente quatrocentos casos de gastroenterite devido à contaminação por uma linhagem enteroinvasiva (JAY, 2005). Nos EUA, entre 1998 e 2014, foram investigados 18.211 surtos de DTA, 2,9% deles ocasionados por *E. coli* patogênica (CDC, 2016). É de preocupação nacional e internacional o potencial risco que a *E. coli* enterohemorrágica pode representar para a saúde pública. Este patógeno é um desafio para indústria alimentícia e para a cadeia alimentar (ROSA *et al.*, 2016). Embora alguns trabalhos constatem uma elevada ocorrência cepas STEC em bovinos no Brasil (CERQUEIRA *et al.* 1997; 1999; GONZALEZ, 2003; TRISTAO, 2007; FARROKH *et al.*, 2013), pouco se sabe sobre a transmissão por produtos de origem animal em nosso país, como carne, leite e seus derivados. Na literatura, já foram reportados isolamentos de STEC pertencentes a sorovares diferentes de O157 em produtos de origem animal em diversos países (BOSILEVAC & KOOHMARAIE, 2011; FARROKH *et al.*, 2013; MOHAMMED *et al.*, 2014).

Estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2015) evidenciou a presença de *E. coli* potencialmente patogênicas na cadeia produtiva de queijos elaborados a partir de leite cru em cinco pequenas propriedades leiteiras, produtoras de queijos, no município de Jaboticabal, São Paulo. Após análise de 100 amostras, detectaram-se isolados potencialmente EPEC em leite, fezes, balde, água, tubulação de ordenha mecânica, superfície de elaboração de queijo, balde, peneira e queijo. Além disso, encontrou-se EPEC em queijos e STEC em leite e fezes.

Quanto aos coliformes termotolerantes, vários estudos em queijos, evidenciaram sua presença em limites acima do estabelecido pela legislação em nosso país (COSTA; OKURA & MOACIR; REZENDE *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2011; LUCAS *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014; APOLINÁRIO *et al.*, 2014). Por outro lado, Ribeiro *et al.* (2012) não constataram a presença de coliformes termotolerantes acima do estabelecido em amostras de queijos ralados comercializados

no Paraná, assim como, Castro *et al.* (2013) em queijos mussarela comercializados na central de abastecimento da secretaria da agricultura (CEASA) em Vitória da Conquista.

2.2.4 *Staphylococcus* coagulase positivo

Staphylococcus são cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro agrupados em massas irregulares ou sob a forma de cachos de uva, raramente apresentam cápsula. São imóveis, não formam esporos e são capazes de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela produção da enzima catalase. A maioria das espécies são anaeróbicas facultativas, mas seu crescimento mais rápido se dá na presença de oxigênio. Seu metabolismo pode ser respiratório e fermentativo. Podem, ainda, metabolizar a glicose tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, sendo a fermentação deste açúcar um importante diferencial desse gênero em relação ao *Micrococcus* sp. (SCHLEIFER; BELL, 2009; MARKEY *et al.*, 2013).

Ainda quanto às características metabólicas, *Staphylococcus* sp. crescem sob pressão osmótica alta, são resistentes ao dessecamento e toleram altas concentrações de sal (até 10% NaCl). Mesófilas, desenvolvem-se em uma faixa de temperatura entre 7 e 48°C com temperatura ótima de multiplicação entre 35°C e 37°C, além de se desenvolverem em faixas de pH entre 4,0 e 9,8 (SCHLEIFER; BELL, 2009). Atualmente, o gênero compreende 52 espécies e 28 subespécies (<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>), algumas destas associadas a uma variedade de infecções de caráter oportunista tanto em humanos quanto em animais (KONEMAN 2012, MOHAMMADI, 2014).

Embora *Staphylococcus* tenha sido inicialmente isolado de sítios de infecção, pode ser encontrado na pele e membranas mucosas de humanos e animais sem causar danos à saúde, sendo considerados parte da microbiota natural (SCHLEIFER; BELL, 2009). Podem, ainda, estar presentes em diversos nichos na natureza como solo, ar e água. Tal distribuição possibilita com que este microrganismo também seja encontrado em muitos alimentos como contaminantes (SANTANA *et al.*, 2010; RUARO *et al.*, 2013; MELLO *et al.*, 2014; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2015; KÜREKCI, 2016) ou como coadjuvantes nos processos tecnológicos, principalmente em carnes fermentadas (IRLINGER, 2008; BERNARDI; GOLINELI; CONTRERAS-CASTILLO, 2010).

Desde 1940, quando o pesquisador Fairbrother sugeriu o teste da coagulase como critério de classificação de espécies patogênicas de estafilococos, estes são distinguidos em dois grupos principais: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). A coagulase livre é a enzima que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina através da ativação da trombina, sendo considerado um fator de virulência nas espécies de *Staphylococcus* (MADIGAN *et al.*, 2010).

A capacidade patogênica dos estafilococos é atribuída a uma combinação de propriedades que contribuem para a colonização e permanência da bactéria no seu hospedeiro e no ambiente. Essas propriedades incluem a habilidade de produzir hemolisinas, nucleases, proteases, exoproteínas e resistência a antimicrobianos, além da capacidade de formarem biofilme, o qual colabora para sua permanência em tecidos e superfícies abióticas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009). O gênero inclui patógenos de humanos e animais, tanto os coagulase positiva (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*), quanto os coagulase negativa como *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, e *S. haemolyticus*, entre outros (ZELL *et al.*, 2008; BLAIOTTA *et al.*, 2010).

Staphylococcus aureus é o representante mais estudado do gênero, conhecido mundialmente por estar relacionado com diversas intoxicações e infecções em humanos e animais (MORRIS *et al.*, 2006; QUINN *et al.*, 2011; PANTOSTI, 2012; PEACOCK & PATERSON, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016). No entanto, outros SCP podem ser importantes patógenos oportunistas, como é o caso de *S. intermedius* que pode causar mastites e infecções em equinos, *S. hyicus* (coagulase variável), é o agente etiológico da epidermite exsudativa em suínos, mas pode, também, estar associado a infecções de pele em bovinos e equinos, osteomielite em bovinos e aves; e, ocasionalmente, em mastite bovina. *Staphylococcus delphine* foi relacionado a infecções de pele de golfinhos e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* à otite externa em cães (SCHLEIFER & BELL, 2009; QUINN *et al.*, 2011). *Staphylococcus pseudintermedius* é um patógeno oportunista e uma das principais causas de infecções de pele e ouvido, e infecções de feridas pós-operatórias em cães e gatos. Desde 2006, quando a resistência à meticilina foi identificada nesta espécie, *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) tem sido considerado como um problema de saúde

animal e o tratamento das infecções por MRSP um desafio para a medicina veterinária (DUIJKEREN *et al.*, 2011; GODOY *et al.*, 2016).

A pesquisa de *Staphylococcus* em alimentos é uma prática importantíssima do ponto de vista sanitário, quando se estabelecem padrões de qualidade higiênica e também pela capacidade das diferentes espécies de *Staphylococcus* produzirem enterotoxinas passíveis de provocar gastroenterites nos seres humanos acompanhada ou não de diarreia (DINGES, ORWIN, SCHLIEVERT, 2000). Das 52 espécies descritas até o momento, sete são capazes de produzir a enzima extracelular coagulase e em três a produção é considerada variável, entre estas podemos citar: *S. aureus*; *S. intermedius*; *S. delphini*; *S. lutrae*; *S. agnatis*; *S. argentus*; *S. schwikseri*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hycus* (EUZÉBY, 2018). Entre as espécies de SCP apenas três (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hycus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas associadas a surtos de intoxicação alimentar (GANDRA, 2006; SANTANA *et al.*, 2010)

Durante anos a capacidade de produzir coagulase, termonuclease e enterotoxinas foram associadas apenas à *S. aureus*, o que fez com que essa fosse a espécie coagulase positiva mais pesquisada no Brasil, principalmente por estar presente em alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar e por determinação da Portaria nº 451 (de 19 de setembro de 1997) que vigorou até o fim do ano 2000 (BRASIL, 1997). No entanto, em função da semelhança fenotípica entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva houve uma mudança nos padrões sanitários da legislação brasileira e, a partir do ano 2001, com a publicação da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA), foram previstos limites para *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos (SILVA *et al.*, 2015).

As características que permitem o desenvolvimento de *Staphylococcus* nos alimentos inclui sua capacidade de multiplicação em ampla faixa de temperatura (7 - 48°C) e pH (4,2 - 9,3). Além disto, toleram meios contendo até 10% de sal (NaCl) (WONG & BERGDOLL, 2002) com capacidade de produção de enterotoxina na faixa entre 10°C e 46°C (FRANCO, 2008), o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de *Staphylococcus* (SANTANA *et al.*, 2010) e, se multiplicam em alimentos apresentado aw entre 0,83 e 0,99 (WONG & BERGDOLL, 2002).

A origem da contaminação por SCP no alimento está, geralmente, relacionada à má qualidade da matéria prima, falta de saneamento adequado em equipamentos e

utensílios e a má higiene pessoal dos manipuladores de alimentos (AGURDIN *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2013; HO *et al.*, 2015). No entanto, a ocorrência desse microrganismo pode acontecer no pós-processamento mesmo em queijo produzido com leite pasteurizado devido a falhas no processo de pasteurização, contaminação cruzada a partir de manipuladores portadores (cavidade nasal, mãos) e, ainda, devido ao acondicionamento em temperaturas inadequadas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008) Carmo & Linard (2002) ressaltam que *Staphylococcus* são termolábeis e, portanto são destruídos pelo tratamento térmico já suas enterotoxinas, termoestáveis, permanecem ativas nos alimentos sendo um risco em potencial para a saúde pública.

A intoxicação alimentar estafilocócica, causada pela ingestão de enterotoxinas (SEs) pré-formadas no alimento (AYDIN *et al.*, 2011), principalmente por *S. aureus*, é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns no mundo (HENNEKINE *et al.*, 2012; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). No Brasil, *Staphylococcus aureus* é citado como principal envolvido em 5,7% das DTAs (BRASIL, 2017). A primeira descrição da espécie como patógeno alimentar ocorreu em 1884, por Vaughan e Sterberg e, desde então, tem sido identificada em ampla variedade de alimentos envolvidos em intoxicações alimentares em diversos países (HENNEKINNE *et al.*, 2012). De modo geral, os surtos alimentares por estafilococos estão associados a alimentos crus ou mal cozidos, como leite cru e derivados, tortas recheadas com creme, salada de batata, atum, frango, presunto, carnes, embutidos e produtos à base de ovos (LE LOIR *et al.*, 2003).

Várias são as condições necessárias para que ocorra produção de enterotoxina nos alimentos, dentre as principais que o alimento forneça condições para o crescimento bacteriano, como temperatura e teor de água satisfatório, e que as cepas presentes tenham capacidade enterotoxigênica (PRADO *et al.*, 2015). A produção de enterotoxinas é influenciada pela temperatura, pH, aw, tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato (SCHELIN *et al.*, 2011). Nos alimentos as enterotoxinas aumentam rapidamente se houver temperaturas adequadas (20-37 °C) e pH (4-7,4). Por isso os alimentos expostos a temperaturas mais elevadas apresentam um maior potencial à produção de enterotoxinas pelos estafilococos, em especial alimentos fermentados e lácteos (WU *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação das SEs ainda não é totalmente compreendida. Alguns pesquisadores afirmam que a intoxicação resulta em uma resposta inflamatória em todo

o trato gastrointestinal, caracterizada por danos no jejuno e íleo. Outros pesquisadores mostraram que as SEs não atuam diretamente do trato gastrointestinal, mas indiretamente afetam a expressão de citocinas e metabólitos produzidos por células T, macrófagos, monócitos e mastócitos (WU *et al.*, 2016).

O período de incubação da intoxicação estafilocócica varia de 1 a 8 horas após a ingestão do alimento contaminado (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Os principais sinais clínicos observados em humanos incluem náusea, vômito, dores abdominais com ou sem diarreia, cefaleia e prostração, sendo que os mesmos podem variar de acordo com grau de susceptibilidade do indivíduo e a concentração de SEs presente no alimento (PEREIRA *et al.*, 2009; AGURDÍN *et al.*, 2010; RAHIMI *et al.*, 2013; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014; JOHLER *et al.*, 2015) sendo mais grave em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas por doenças crônicas. Segundo Borges (2008), o caráter do curso da doença (24-48 horas sem necessidade de hospitalização) é responsável pela subnotificação desta intoxicação.

As crianças podem adoecer por ingestão de 100 ng de SEs, e as populações vulneráveis podem desenvolver intoxicação alimentar estafilocócica com alguns microgramas de toxina (WU *et al.*, 2016). O diagnóstico de intoxicação alimentar por estafilococos de uma forma geral é confirmado pela identificação de pelo menos 10^5 UFC g^{-1} de *S. aureus* a partir de restos de alimentos ou pela detecção de SEs remanescentes nos alimentos. O *S. aureus* é sensível ao calor, podendo ser inativado durante o processamento de alimentos, no entanto suas enterotoxinas não o são. Dessa forma, não é possível diagnosticar de forma definitiva um surto de intoxicação alimentar apenas enumerando os SCP em alimentos remanescentes ou pela detecção de genes em cepas isoladas (HENNEKINNE *et al.*, 2012).

Os alimentos envolvidos em surtos de intoxicação por ingestão de toxina estafilocócica variam nos diversos países e em diferentes regiões de um mesmo país devido às diferenças nos hábitos alimentares (CARMO *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2008; VERAS *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014). Além disso, mudanças no foco de controle das doenças alimentares, propostas pelos programas de saúde nos países, também podem interferir na variação dos agentes e matrizes envolvidas em surtos ao longo do tempo (PIRES *et al.*, 2011).

Leite e seus derivados são destaque entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicação estafilocócica (BORGES *et al.*, 2008). Em outros países, alguns autores encontraram *S. aureus* enterotoxigênicos a partir amostras de queijos (LITTLE

et al., 2008; PEREIRA *et al.*, 2009; ROSENGREN *et al.*, 2010; BIANCHI *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, entre 1993 e 2006, 121 surtos cuja fonte era produtos lácteos foram reportados, em 54% dos surtos o produto referido foi queijo (LANGER *et al.*, 2012). Can e Çelik (2012) investigaram a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos em queijos na Turquia e observaram três cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos, duas SEC e uma SEC/SED concomitantemente.

Entre 2000 e 2010 foram notificados 239 surtos no estado de São Paulo relacionados ao consumo de produtos lácteos; dos agentes bacterianos identificados, *S. aureus* foi o mais frequente (MERUSSI *et al.*, 2012). Segundo Borges (2008), os surtos de DTA envolvendo produtos lácteos investigados no Brasil, têm sido associados, principalmente, ao consumo de queijos do tipo Minas frescal, Minas padrão e queijo coalho. Carmo *et al.* (2002) descreveram um surto de intoxicação ocorrido em Minas Gerais, em 1999, no qual 50 pessoas apresentaram sintomas de vômito, diarreia, cólica, calafrios e dor de cabeça, após consumirem queijo. A vigilância sanitária local foi notificada e coletou amostras de queijos e uma amostra de leite cru utilizada na fabricação do referido queijo. Nas amostras de queijo foram identificadas *Staphylococcus* coagulase positivo, confirmando *S. aureus*, com contagens maiores que 2×10^8 UFC/g, com a presença de SEA, SEB e SEC; o leite cru apresentou SEA e SEB. Arcuri *et al* (2010) analisaram isolados de *S. aureus* isolados de leite de vaca com mastite, amostras de leite de tanques e de queijos dos principais laticínios inspecionados da região de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Em torno de 14% dos 125 isolados de leite foram positivos para um ou mais genes de enterotoxinas (*sea-see*, *seg*, *seh*, *sei* e *selj* e *sell*), o mesmo ocorreu para 43% dos 96 isolados de leite de tanques e 73% dos 70 isolados de queijo. Veras *et al.* (2008) estudando 30 cepas de SCP e SCN, isoladas de produtos lácteos envolvidos em surtos de enfermidades alimentares ocorridos no estado de Minas Gerais em um período de quatro anos, mostraram que 38% das cepas carregavam somente o gene *sea*, 29% somente o gene *seb* e 24% *sea* e *seb*.

No Brasil, há diversos relatos sobre a ocorrência de SCP em número superior ao limite estabelecido pela legislação vigente (ANVISA) para queijos. No Paraná, Lucas e colaboradores (2012) relataram que 12,5% das amostras de queijo colonial estavam em desacordo com a legislação. Assim como Pinto *et al* (2011), Komatsu *et al* (2010) e Castro *et al* (2013) que observaram *Staphylococcus* coagulase positiva em desacordo com a legislação em 25%, 88% e 100% das amostras, respectivamente. Aguilar *et al.* (2016) observaram *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos

pela legislação em 16,6% e 88,3% dos queijos parmesão, ralados na indústria e no comércio varejista, em São Paulo. Em estudo realizado por Santos *et al.* (2008), de 16 amostras de queijos minas frescal analisados, 87,5% deles apresentaram contagens acima do permitido pela legislação. Leite *et al.* (2005) também obtiveram a maior parte das amostras (86,7%) de queijos minas frescal em Cuiabá apresentando contagens acima dos padrões estabelecidos para SCP. Andrade *et al.* (2011), em estudo realizado em Fortaleza, Ceará, em 300 amostras de queijo de coalho provenientes de 15 marcas (sete artesanais e oito industrializadas) detectaram alta frequência de *S. aureus* (100%) nas amostras de queijo de coalho artesanais. Borges *et al.* (2008) avaliaram a contaminação de SCP na linha de produção de queijos de coalho e encontraram populações variando de $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹ no leite cru, < 1 UFC/g a $2,0 \times 10^2$ UFC/g nas amostras de queijo, sendo SCP detectados em 100% das amostras de leite cru (25/25) e em 8% (2/25) das amostras de queijo sendo que, das 12 espécies de *Staphylococcus* identificadas, nove eram SCN e três SCP (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*). Os autores também detectaram a presença de enterotoxinas em 20% das amostras provenientes do leite cru que, pela sua termo-estabilidade também foram detectadas no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo. Andrade *et al.*, (2011) avaliaram a presença de *Staphylococcus* sp. em queijos de coalho. Dos 193 isolados, foram identificadas quatorze espécies diferentes, sendo onze SCN e três SCP. No Rio Grande do Sul, Zocche *et al.* (2012) detectaram SCP em 10,7% das amostras de queijos comercializadas na cidade de Pelotas.

2.2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são definidos como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e que se agrupam em formato de cachos de uva. Apresentam a enzima coagulase, fazendo parte do grupo denominado estafilococos coagulase positiva (SCP) (TRABULSI *et al.*, 2008). Essa espécie é considerada a mais virulenta do gênero e sua patogenicidade está relacionada a uma combinação de fatores de virulência como produção de toxinas, capacidade invasiva e resistência a antimicrobianos (ARGUDIN *et al.*, 2010).

Trata-se de um microrganismo ubíquo, com capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes variedades de ambientes por um longo período de tempo, tornando sua presença na natureza amplamente distribuída (WINN *et al.*, 2006;

KLUYTMANS, 2010). É uma bactéria mesófila, com temperatura de crescimento entre 7 e 48°C, com temperatura ótima de crescimento em 37°C. Pode produzir enterotoxina entre 10 e 48°C, sendo a temperatura ótima de 40 a 45°C. Multiplica-se em pH entre 4,2 e 9,8, com faixa ótima entre 6,0 a 7,0, em alimentos com atividade de água inferior à 0,86 e em concentrações de cloreto de sódio de 7 a 10%, podendo ser, em algumas linhagens, de até 20% (WINN *et al.*, 2006).

Staphylococcus aureus é capaz de sobreviver como comensal da pele, membranas mucosas, fossas nasais e outros sítios anatômicos, tanto de humanos quanto de animais (WERCKENTHIN *et al.*, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003; AARESTRUP *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010; KLUYTMANS, 2010; WENDLANDT *et al.*, 2013b), podendo estar associado a infecções em hospedeiros de forma localizada, sistêmica e recorrente, sendo considerado um patógeno importante tanto para a medicina humana quanto para a veterinária (SUTRA & POUTREL, 1993). Portanto, este microrganismo tem potencial para infectar, colonizar e/ou contaminar seus hospedeiros. Acredita-se que cerca de 30% dos seres humanos saudáveis sejam portadores de *S. aureus* na mucosa nasal (WENDLANDT *et al.*, 2013b) e, de acordo com Kluytmans *et al.* (1997), alguns indivíduos podem ser colonizados transitoriamente, enquanto outros são portadores persistentes deste microrganismo. Como parte da microbiota humana, a referida bactéria não constitui um risco, podendo ser carregada por um longo período sem prejuízos à saúde dos indivíduos (SKOV; JERSEN, 2009). Contudo, em situações de imunossupressão a presença de *S. aureus* pode favorecer a ocorrência de doença (GELATTI *et al.*, 2009).

Para caracterização definitiva de *S. aureus* é necessário o emprego de técnicas moleculares uma vez que testes fenotípicos não são definitivos na caracterização em nível de espécie (FARBER *et al.* 2001). Existem alguns genes específicos de *S. aureus* tais como *nuc*, que codifica a enzima termonuclease (BRAKSTAD *et al.*, 1992; GANDRA *et al.*, 2011), o *coa* que codifica a enzima coagulase (DA SILVA *et al.*, 2003; RALL *et al.*, 2014) e *femA* (DIAS, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Os genes *femA* e *femB* estão situados no *operon femAB*, sendo genes críticos para o metabolismo celular (*housekeeping genes*) por estarem envolvidos na síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana. Tais genes são específicos da espécie *S. aureus*, embora alelos *femAB* similares na organização e na sequência já tenham sido identificados em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (MOUSSALLEM; KURY; ACOSTA, 2007; TON-

THAT; FAULL; SCHNEEWIND, 1997). A amplificação da proteína A descrita por Shopsin *et al* (1999) também tem sido empregado na identificação de *S. aureus*.

No homem, *S. aureus* é isolado de diversas enfermidades do sistema tegumentar, como furunculoses, impetigo e abscessos, além de afetar tecidos moles e ósseos. Também podem causar bacteremias e intoxicações manifestadas como gastroenterites, síndrome da pele escaldada e do choque tóxico (ENRIGHT *et al.*, 2000; SIBBALT *et al.*, 2006; LOWDER *et al.*, 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016). Nos animais, *S. aureus* podem causar mastites, lesões supurativas em bovinos, piodermites e infecções urinárias em cães, lesões de pele e artrites em aves e lesões supurativas em suínos (MORRIS *et al.*, 2006; QUINN *et al.*, 2011; PANTOSTI, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2016). Tem sido reportado numa variedade de infecções em animais, porém as mais significantes, economicamente, são as mastites em gado leiteiro e pequenos ruminantes (PEACOCK; PATERSON, 2015). Além disso, a contaminação ambiental durante a ordenha ou processamento do leite, torna este produto um dos principais alimentos veiculadores desta bactéria, e conseqüentemente, seus derivados, como os queijos (FERREIRA *et al.*, 2010; KLUYTMANS, 2010; SERIDAN *et al.*, 2012).

A importância de *S. aureus* não está apenas relacionada ao fato de estar envolvido em infecções tanto em humanos quanto em animais, mas também ao risco que esta espécie representa em saúde pública devido a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis em alimentos (LAMAIA *et al.*, 2005; VIÇOSA *et al.*, 2010; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014) e veicular genes de resistência a antimicrobianos (RICH *et al.*, 2005; BEN SAID *et al.*, 2016).

Análises da distribuição genotípica de cepas de *S. aureus* de diferentes origens demonstrou certa especificidade por hospedeiro, sugerindo a ocorrência de algumas linhagens estafilocócicas restritas aos animais (L-SUNG *et al.*, 2008; BYSTRÓN *et al.*, 2010). Assim, *S. aureus* associado à pecuária pode ser uma fonte subestimada de cepas patogênicas (NAKONIECZNA *et al.*, 2010).

Vários fatores de virulência podem contribuir para as diferentes formas de patogenicidade em *S. aureus*, sendo divididos em grupos, como toxinas, enzimas, fatores de adesão e de invasão e superantígenos (DINGES *et al.*, 2000; PEACOCK *et al.*, 2002; HAVERI *et al.*, 2007). Estes fatores são produzidos por diferentes cepas do microrganismo e podem atuar de forma isolada ou coordenada e sinérgica, estando associado às infecções severas (RASIGADE & VANDENESCH, 2014). No que se refere à patogênese do *S. aureus*, a variação genética entre cepas garante as diferenças

observadas frente à capacidade de provocar infecção em um determinado hospedeiro, uma vez que, aproximadamente 75% do genoma bacteriano é constituído por um núcleo conservado e constante, 10% de regiões variáveis e 15% por elementos genéticos móveis (plasmídeos, ilhas gnômicas e de patogenicidade), carreando genes de virulência e resistência (ALIBAYOV *et al.*, 2014).

Em *S. aureus*, um dos sistemas de regulação mais conhecidos é o *accessory gene regulator (agr)*, responsável por regular vários fatores de virulência (MELAKE *et al.*, 2014), incluindo hemolisinas, enterotoxinas, enzimas e proteínas de superfície (BOYEN *et al.*, 2009). A atuação do sistema *agr* está associada ao *quorum-sensing*, onde é possível detectar a densidade celular em determinado meio, através da secreção e detecção de moléculas pelas próprias bactérias, possibilitando a comunicação entre elas. O locus *agr* é composto por dois operons, um controlado pelo promotor P2 e o outro pelo promotor P3. O *operon* que contém o promotor P2, apresenta quatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. Nesse *operon*, ocorre a codificação das proteínas AgrB e AgrD, que juntas, formam um peptídeo-auto-indutor (AIP) e da AgrC, que é uma proteína transmembrânica com receptor para AIP. Já o operon comandado pelo promotor P3 contém um gene para o RNAm, chamado de RNAIII, considerado efetor do sistema *agr*. Quando AIP liga-se a AgrC, ativa a proteína AgrA, que age como indutor dos promotores P2 e P3, ativando os operons, assim, o RNAIII funciona como indutor ou repressor da transcrição de genes. Portanto, o resultado final da cascata do locus *agr* é o RNAIII, responsável pelo aumento da transcrição dos genes codificadores dos fatores de virulência (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003).

Em *S. aureus* existem quatro tipos diferentes de *agr* (I, II, III, IV) determinados pelo polimorfismo da sequência de aminoácidos dos genes de *agrD* e *agrC* (SHOPSIN *et al.*, 2003; SINGH & RAY, 2014). Alguns estudos apontaram que o grupo *agrI* é prevalente entre os isolados de mastite, os grupos *agrII* e *agrIII* parecem estar mais associados a isolados com resistência a antimicrobianos e o *agrIV* parece estar envolvido com cepas produtoras de esfoliatina, toxina responsável pela síndrome da pele escaldada (JARRAUD *et al.*, 2000; MOISE-BRODER *et al.*, 2004; VAUTOR *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus é capaz de produzir mais de 30 fatores de virulência, principalmente, proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas, (KROPEC *et al.*, 2005) que lhe permitem além da invasão direta dos tecidos a evasão do sistema imune, proliferação e sobrevivência no hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2007; OTTO, 2015). Estes

fatores podem ser parte da célula bacteriana, de cunho estrutural ou enzimas secretadas por ela (KONEMANN *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus* contém na estrutura de sua parede celular, polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes, tais como: ácido teicóico, glicanopeptídeo, proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas que garantem a aderência à célula do hospedeiro ou à matriz extracelular (Tabela 2) (LUTZ *et al.*, 2003). O alto potencial infeccioso de *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas (Tabela 3). A coagulase, hialuronidase, catalase, DNase, lipase, protease e esterase, são algumas das enzimas produzidas para esse fim. Dentre as enzimas produzidas pela bactéria, destacam-se a catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio; a termonuclease (Tnase) responsável pela degradação do DNA e RNA em fosfomononucleosídeos, e a coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência à opsonização e à fagocitose (KONEMAN *et al.*, 2012). A maioria das cepas secreta enzimas e citotoxinas como nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e colagenase e quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta). Alguns tipos de alfa e beta hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, e degradam tecidos (NAGASE *et al.*, 2002; ZSCHOCK *et al.*, 2005).

Além disto, *S. aureus* produz uma série de toxinas, às quais têm sido atribuída uma importante participação na patogenia das doenças causadas por este microrganismo. Entre as toxinas produzidas, destacam-se as enterotoxinas (SEs), a esfoliatina, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), hemolisinas e leucocidinas (TRABULSI, TEIXEIRA, BUERIS, 2004). De acordo com Argudin *et al.* (2010) e Ordega *et al.* (2010) as SEs representam os fatores de virulência mais notáveis deste microrganismo dada a importância do envolvimento das mesmas em casos e surtos de intoxicação alimentar.

Tabela 2 - Constituintes da parede celular do *S. aureus*, que participam da colonização e invasão.

Constituintes	Modo de ação
Ácido Teicóico	Ativa a via alternativa do complemento e estimula a produção de citocinas.
Glicanopeptídeo	Polímero que atua como receptor para leucócitos polimorfonucleares e induz a produção da IL-1, que vai atuar como elo entre as respostas inflamatórias e imunes, e opsoninas, que revestem a bactéria, tornando-a facilmente fagocitada.
Proteína A	Proteína ligada ao peptidoglicano que se liga a porção Fc da molécula IgG, contribuindo para a geração de efeitos quimiotáticos, anti-fagocitários, com liberação de histamina, reações de hipersensibilidade e lesão plaquetária.
Cápsula	Estrutura que envolve a parede celular protegendo a bactéria da fagocitose mediada pelo complemento (C3b) por parte de neutrófilos, aumentando a capacidade de invasão de tecidos até chegar a corrente sanguínea.
Adesinas	Moléculas que promovem a aderência bacteriana às células do hospedeiro e a diversos tipos de matrizes

Fonte: Adaptado de Markey *et al.*, 2013.

Tabela 3 - Enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus* e suas funções na infecção.

	Classe	Função
Coagulase	Enzimas	Converte o fibrinogênio em fibrina, provocando a formação de trombos de fibrina.
Hialuronidase	Enzimas	Despolimeriza o ácido hialurônico, auxiliando a invasão dos tecidos.
Catalase	Enzimas	Converte peróxido de hidrogênio em oxigênio e água evitando a destruição da bactéria.
Alfa-hemolisinas	Toxinas	Tem a capacidade de promover a lise dos eritrócitos e em casos de intoxicações muito graves, causar danos a plaquetas.
Beta-hemolisinas	Toxinas	Degrada a esfingomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos.
PVL	Toxinas	Altera a permeabilidade da membrana e lisa leucócitos e macrófagos.
TSST-1	Toxinas	Provoca erupção cutânea descamativas, febre alta, choque e falência múltipla de órgãos: Síndrome do Choque Tóxico.
Enterotoxinas	Toxinas	Toxinas pirogênicas, termo-estáveis, responsáveis por intoxicações alimentares.
Esfoliatina	Toxinas	Promove a clivagem do extrato granuloso na epiderme, causando síndromes cutâneas severas.

Fonte: Adaptado de Markey *et al.*, 2013.

A toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) foi descrita pela primeira vez em 1978 em sete crianças com infecções por *S. aureus* (TODD *et al.*, 1978). Já o primeiro relato da produção da TSST-1, por uma cepa de origem animal, ocorreu quase 10 anos depois (JONES & WIENEKE, 1986). A TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas (CARDOSO *et al.*, 2000), estimulando os linfócitos T a liberarem citocinas que provocam o choque (PARRILO *et al.*, 1993), causando sintomas graves e sistêmicos, caracterizados por febre, vômito, diarreia, hipotensão, anormalidades neurológicas além de descamação da pele das mãos e pés (PRAJAPATI, 2010). A síndrome do choque tóxico (TSS), em humanos, pode ocorrer em associação ao período menstrual, que ocorre em mulheres onde, cepas de *S. aureus* produtoras da TSST-1 colonizam a mucosa vaginal e produzem a toxina, que atravessa a barreira da mucosa, ou na forma não-menstrual, onde a TSS, ocorre por infecção do *S. aureus* em qualquer local do organismo (MCCORMICK *et al.*, 2001). O gene responsável pela produção da toxina (*tst*) já foi observado em *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite, como relatado por Takeuchi *et al.* (1998), Cardoso *et al.* (2000) e Lim *et al.* (2004). Em cepas de *S. aureus* provenientes de bovinos, o gene *tst* foi encontrado em um elemento genético móvel e a linhagem ET3-1 foi o isolado fonte da descoberta e caracterização da ilha de patogenicidade SaPIbov1 (FITZGERALD *et al.*, 2001). Quando o gene da TSST-1 está associado ao de enterotoxinas, a cepa pode ter sua patogenicidade aumentada, uma vez que passam a atuar como superantígenos para as células do sistema imune (YOKOMIZO *et al.*, 1995; FERENS *et al.*, 1998). Além disso, essas cepas presentes no leite cru e derivados fornecem riscos para os consumidores e a gravidade dos sintomas pode variar de acordo com as condições físicas de cada pessoa.

A leucocidina *Panton-Valentine* (PVL) é uma citotoxina que provoca destruição dos leucócitos e necrose tecidual (GENESTIER *et al.*, 2005). Embora produzida por aproximadamente 5% das cepas de *S. aureus* isolados de casos de mastite, o gene *pvl* é encontrado em grandes porcentagens de isolados que causam infecções cutâneas humanas podendo causar necrose e pneumonias graves (LINA *et al.*, 1999; GILLET *et al.*, 2002). A presença do *pvl* já foi documentada em cepas de *S. aureus* meticilina sensíveis (MSSA) e em meticilina resistentes (MRSA) (BOUBAKER *et al.*, 2004). Na América do Norte, o *pvl* foi associado, principalmente, a cepas MRSA (VANDENESCH *et al.*, 2003), enquanto no Reino Unido, a associação mais observada ocorreu com cepas MSSA (SHALLCROSS *et al.*, 2013). Bazzi *et al.* (2015) e Turner *et*

al. (2015) isolaram cepas MSSA com esse gene em pacientes de um hospital. O gene para a produção da toxina também tem sido isolado de cepas provindas de vacas com mastite, como demonstrou Pájic (2014).

Alguns isolados produzem também as chamadas toxinas esfoliativas (ET) que promovem a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas. As duas principais isoformas ET de *S. aureus*, ETA e ETB, biológica e sorologicamente distintas, são primariamente responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada ou doença de Ritter e impetigo bolhoso em humanos (NAGASE *et al.*, 2002; ZSCHOCK *et al.*, 2005).

2.2.4.1.1 *Staphylococcus aureus* em alimentos

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que *S. aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos (LE LOIR *et al.*, 2003; CARMO, 2002). A intoxicação estafilocócica resulta da ingestão de alimento contendo toxina estafilocócica enterotoxigênica (SEs) produzida durante a multiplicação de estafilococos e os efeitos são em nível de trato gastrointestinal (GUIMARÃES *et al.*, 2013). A produção da toxina no alimento processado, principalmente cárneos e lácteos, se dá durante a sua manipulação e subsequente estocagem em temperaturas elevadas (ARGUDIN *et al.*, 2010; OMOE *et al.*, 2013).

Durante o processamento de um alimento, normas de higiene devem ser observadas evitando a contaminação dos mesmos com patógenos. Eventuais deficiências no processamento do alimento podem levar à permanência de microrganismos patogênicos no produto final, assim como inconformidades na sua manipulação e armazenamento podem favorecer sua contaminação (MESQUITA *et al.*, 2006). A rota de transmissão da microbiota animal ao homem se dá a partir do consumo de produtos de origem animal contaminados.

São apontadas cinco condições para a ocorrência de surtos de intoxicação estafilocócica: (1) uma fonte contendo estafilococos com a presença de genes que codificam enterotoxinas: matérias primas, manipulador doente ou saudável; (2) transferência de estafilococos da origem para o alimento: contaminação cruzada do alimento (3) composição do alimento com características físico-químicas favoráveis para o crescimento de estafilococos e para a produção de toxinas; (4) alimento

contaminado mantido em temperatura favorável e tempo suficiente para a bactéria se multiplicar e produzir as toxinas; (5) ingestão do alimento contendo quantidade suficiente de toxinas para promover os sintomas (HENNEKINNE *et al.*, 2012).

A presença de *S. aureus* em leite e derivados sugere o uso de matéria prima de animais infectados (mastite) ou a probabilidade do agente contaminante ter sido introduzido através de manipuladores assintomáticos (ACCO *et al.*, 2003; VISOTTO *et al.*, 2011). O fato de *S. aureus* ocorrer em alimentos altamente manipulados está relacionado ao seu habitat natural: pele e fossas nasais de humanos e animais (WONG; BERGOLL, 2002; LE LOIR *et al.*, 2003). É a partir da cavidade nasal que o microrganismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos, ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo (LE LOIR *et al.*, 2003). A ocorrência natural do patógeno em glândulas mamárias de bovinos, principalmente como agente etiológico de mastites, contribui para a sua ocorrência no leite e derivados (FAGUNDES *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010; KLUYTMANS, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SERIDAN *et al.*, 2012; BEN SAID *et al.*, 2016).

Além da produção de enterotoxinas, a capacidade de formação de biofilmes no ambiente de processamento de leite que *S. aureus* apresenta contribui para a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária nas mastites bovinas (LEE *et al.*, 2013). A estrutura de biofilme protege a bactéria contra altas concentrações antimicrobianas e fagocitose, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis no hospedeiro (XUE; CHEN; SHANG, 2014).

A presença de enterotoxinas estafilocócicas é um dos principais fatores de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de DTA (LE LOIR *et al.*, 2003; ARGUDÍN *et al.*, 2010; ARGUDÍN *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus* pode produzir até 23 enterotoxinas, no entanto merecem destaque as enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) (WU *et al.*, 2016), por estarem envolvidas em até 95% dos casos de intoxicação causadas por este microrganismo (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013; NAGARAJ *et al.*, 2014) e as SEs codificadas pelos genes do agrupamento *egc*, recentemente reportadas SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET, e as enterotoxinas-like (SEI) SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, e SEIV, as quais são denominadas emergentes e cujo relacionamento com casos de intoxicações causadas por *S. aureus* tem aumentado nos últimos anos (HENNEKINNE, 2010; ALIBAYOV, *et al.* 2014).

A maioria dos genes SEs é controlada pelo sistema *agr*. Os genes *seb*, *sec* e *sed* têm sido demonstrados como *agr* dependentes, enquanto os *sea* e *sej* independentes (LE LOIR *et al.*, 2003). A provável presença de *S. aureus* e/ou suas SEs em leites crus, queijos e leite pasteurizado, contaminado após processamento térmico representa sério risco ao consumidor (BORGES *et al.*, 2008; ROLA *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016).

As enterotoxinas pertencem à família das toxinas pirogênicas, junto com a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as toxinas esfoliativas A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) (BALABAN; RASOOLY, 2000). As SEs são proteínas com propriedades multifuncionais, conhecidas pela capacidade de interagir com células do sistema linfóide induzindo proliferação e ativação de proteínas reguladoras. Sua capacidade superantigênica diz respeito aos seus efeitos no sistema imune, estimulando linfócitos T auxiliares de forma inespecífica e causando a liberação exacerbada de citocinas. A esse evento, segue-se a toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune, podendo originar uma variedade de sintomas como febre, náuseas, vômitos e choque (BALABAN; RASOOLY, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas na fase de crescimento logarítmico ou no início da fase estacionária das bactérias nos alimentos. As enterotoxinas são estáveis às técnicas de preservação de alimentos, devido à sua estrutura protéica de baixo peso molecular, resistência ao calor ou enzimas proteolíticas (ARGUDÍN *et al.*, 2010). Atualmente, 23 enterotoxinas estafilocócicas foram identificadas como entidades sorológicas distintas, incluindo as clássicas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (WU *et al.*, 2016). No entanto, este universo seria de mais de 40 se fossem contabilizadas suas variantes moleculares SEC₁, SEC₂ e SEC₃, SEC ovina e SEC bovina; SED e SEE e os novos tipos de SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e SEI (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU₂ e SEIV) (AGURDÍN *et al.*, 2010).

Polipeptídeos de baixo peso molecular (entre 27 a 30 kDa) com homologia variável na sequência de aminoácidos (OLIVEIRA; CUNHA; HIROOKA, 1995), as enterotoxinas são classificadas, conforme a sua capacidade de causar emese em seres humanos: em clássicas (SE) e similares - “like” termo original em inglês - (SEI) seguidas de uma letra do alfabeto na ordem de sua descoberta. A nomenclatura oficial das SE segue a recomendação do Comitê Internacional para Nomenclatura de Superantígenos Estafilocócicos (INCSS), a qual propõe que apenas toxinas que induzam emese após administração oral num modelo de primata sejam designadas SEs, enquanto

outras toxinas que ainda não tenham essa comprovação sejam denominadas SEI, indicando que seu potencial em intoxicação alimentar ainda não foi confirmado (LINA *et al.*, 2004).

Suas propriedades físico-químicas como: resistência a altas temperaturas, baixa atividade de água e estabilidade às proteases intestinais e à pepsina, conferem potencial para que permaneçam em alimentos mesmo após a eliminação da cepa produtora, além de não serem inativadas após a digestão. Não só as características de resistência, mas também as características necessárias para que a bactéria produza as toxinas, como a faixa de temperatura (35 e 40°C) e a atividade de água (0,98) (BERGDOLL & WONG, 2006; PAULIN *et al.*, 2012), devem ser consideradas na busca de entender como esses superantígenos são produzidos nos alimentos.

As enterotoxinas são termorresistentes, podendo permanecer em alimentos tratados termicamente. Estudo avaliando a inativação de SEA, SEB e SEC após tratamento térmico em diferentes temperaturas (72°, 85° e 92°C) concluiu que pode ocorrer redução no título das enterotoxinas; no entanto, a quantidade inicial da toxina, e a temperatura influenciam a inativação, existindo diferença, também, entre enterotoxinas (NECIDOVA *et al.*, 2016).

Considerando a temperatura como um fator limitante para produção das enterotoxinas, Bastos (2013) testou sua expressão em baixas temperaturas (12° e 8°C) e percebeu a redução da mesma à 8°C. Apesar de a produção de enterotoxinas não ser completamente inibida pelas baixas temperaturas destaca a importância da manutenção da cadeia de frio para produção de alimentos seguros. Segundo Hennekinne *et al.* (2012), as temperaturas mínimas para a produção de toxinas podem variar entre 15 e 38°C. Além de fatores intrínsecos e extrínsecos já mencionados, a produção de SEs também pode estar relacionada com a concentração bacteriana. Segundo Paulin *et al.* (2012) é necessária uma população de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias por ml ou g (UFC/ml ou g) para que os estafilococos sejam capazes de produzir SEs. No entanto, a população de microrganismos não é, por si só, o determinante para a presença das toxinas. Além disso, existem diferenças entre os antígenos; por exemplo, a concentração bacteriana necessária para expressar SEA e SED pode ser menor do que a necessária para expressar as demais toxinas (BERGDOLL; WONG, 2006).

Os genes codificadores das enterotoxinas (SE e SEI) estão localizados em elementos genéticos acessórios, incluindo plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs), ilha genômica, ou ao lado dos elementos de cassetes

cromossômicos estafilocócicos (SCC) (Tabela 4). A maioria destes são elementos genéticos móveis e sua disseminação entre os isolados de *Staphylococcus* sp. pode modificar sua capacidade de causar doença e contribuir para a sua evolução (ARGUDÍN *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Localização dos genes que codificam enterotoxinas clássicas em *Staphylococcus* spp.

Superantígeno	Localização do gene
SEA	Profago
SEB	Ilha de patogenicidade (SaPI3)
SEC	Ilha de patogenicidade (SaPIbov, SaPI4)
SED	Plasmídeo
SEE	Profago

Fonte: Adaptado de Novick *et al.*, 2001.

Apesar dos genes codificadores de enterotoxinas estarem presentes em muitas cepas isoladas de alimentos (FIJALKOWSKI *et al.*; 2016), nem sempre a expressão da toxina é confirmada. A maioria das informações existentes quanto à determinação de toxinas em alimentos são referentes, quase que exclusivamente, a *S. aureus* (DINGES *et al.*, 2000; ROLA *et al.*, 2015) no entanto, estafilococos coagulase negativa (SNC) também foram determinados a produzir SEs (ZELL *et al.*, 2008; BERTELLONI *et al.*, 2015).

Dados revelam que dentre as SEs, a enterotoxina A é a mais frequentemente relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar (BALABAN; RASOOLY, 2000; VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2004; CREMONESI *et al.*, 2005; CHAVES, 2012), seguida por SED, SEC e SEB e raramente SEE. No entanto, conforme a matriz alimentar estudada, esse perfil pode ser diferente. Estudos têm demonstrado a relação entre a fonte de contaminação e o tipo de SEs produzida por *S. aureus*. SEA e SEB são associadas a contaminações de origem humana, isto é, contaminações cruzadas durante e após processamento (FUEYO *et al.*, 2005), enquanto SEC e SED, estão relacionadas com contaminações proveniente de animais bovinos e suínos, respectivamente (NÁJERA-SANCHEZ *et al.*, 2003; JORGENSEN *et al.*, 2005).

A enterotoxina clássica D esteve presente em 31% das amostras de produtos cárneos analisados por Fijalkowski; Peitler; Karakulska (2016). No queijo Minas, estudado por Rall (2010), a presença de SEA foi notada na maioria dos isolados, enquanto SEB esteve presente na maioria dos isolados (55 dos 263) de leite bovino

analisados por Park *et al.* (2011). Estudo realizado por Filho *et al.* (2007) evidenciou que 91,7% das cepas de *S. aureus* oriundos de leite de animais com mastite apresentaram a produção de pelo menos um tipo de toxina, isoladamente ou em associação, revelando elevado grau de toxigenicidade. A SEC é a mais frequente em isolados de leite, sendo relatada em vários estudos (ARGUDIN *et al.*, 2010; VALIHRACH *et al.*, 2013; CARFORA *et al.*, 2015). Os genes *seg* e *sei* foram encontradas em alta frequência (28,5% e 21%, respectivamente) em um estudo com leite de vacas mastíticas (KOT, *et al.*, 2016), essas toxinas, por já apresentarem atividade emética comprovada, conferem riscos à população consumidora. Vale ressaltar que a SEB não está envolvida apenas na intoxicação alimentar, mas como potencial arma biológica de guerra e terrorismo (Wu *et al.*, 2016).

O período de incubação da intoxicação estafilocócica varia de 1 a 8 horas após a ingestão do alimento contaminado (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais grave em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas por doenças crônicas. Os principais sinais clínicos observados em humanos incluem náusea, vômito, dores abdominais com ou sem diarreia, cefaleia e prostração, sendo que os mesmos podem variar de acordo com grau de susceptibilidade do indivíduo e a concentração de SEs presente no alimento. A diarreia pode ocorrer devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (PEREIRA *et al.*, 2009; AGURDÍN *et al.*, 2010; RAHIMI *et al.*, 2013; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014; JOHLER *et al.*, 2015).

Vários casos e surtos já foram mencionados na literatura. Os alimentos mais frequentes na intoxicação alimentar estafilocócica diferem de um país para outro, devido a diferenças no consumo e hábitos alimentares de cada local. Ostyn *et al.* (2010), relataram a primeira evidência de intoxicação alimentar causada pela SEE na França, após ingestão de queijo fabricado com leite não pasteurizado. Jorgensen *et al.* (2005), após um surto de intoxicação alimentar estafilocócica na Noruega, encontraram SEH em um purê de batatas preparado com leite cru. Giezendanner *et al.* (2009) descreveram um surto ocorrido com crianças na Suíça, após consumo de leite de cabra cru, e detectaram a presença do gene da SED. A mesma amostra de alimento pode conter diferentes enterotoxinas, uma vez que podem estar presentes em diferentes isolados de *S. aureus*. Sendo assim, é importante avaliar vários isolados a partir das placas de cultivo, principalmente nos casos em que sintomas típicos de intoxicação estafilocócica são observados (JORGENSEN *et al.*, 2005). A detecção dos genes responsáveis pela

expressão das enterotoxinas também se torna relevante para auxiliar no levantamento do número de casos de surtos de doenças alimentares e na análise de risco para gastroenterite de origem alimentar (ZOCCHÉ; BASTOS; SILVA, 2010).

2.2.4.1.2 Resistência de *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos

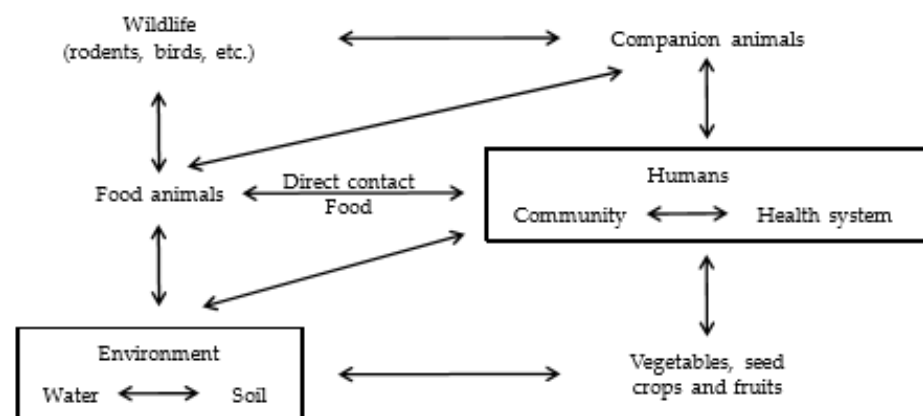
A resistência pode ser classificada como intrínseca (natural) ou adquirida. Sendo que a resistência natural decorre de um fator inerente estrutural ou funcional associado com espécies bacterianas. Já a resistência adquirida é resultante de alterações no genoma bacteriano e que podem ser consequência de uma mutação ao acaso em genes próprios, ou por aquisição horizontal de genes exógenos (SCHWARZ *et al.*, 2006). Existem vários mecanismos de resistência a antimicrobianos adquirida dos quais podemos citar: modificações induzidas na parede celular, ribossomos ou membrana citoplasmática; enzimas que inativam o antimicrobiano; ou pela aquisição de bombas de efluxo (TENOVER, 2006; ALEKSHUN & LEVY, 2007; BOERLIN & WHITE, 2010; WENDLANDT *et al.*, 2013a). A aquisição horizontal de genes de resistência, por sua vez, ocorre a partir dos mecanismos de conjugação, transdução e transformação. (CETINKAYA *et al.*, 2000, TEIXEIRA & FACKLAM, 2003; TENOVER, 2006; GUARDABASSI & KRUSE, 2010; MADGAN *et al.*, 2010).

É importante destacar que a resistência a certos agentes antimicrobianos pode ser selecionada mesmo quando se utiliza outro agente pela seleção cruzada ou pela co-seleção. A seleção cruzada se refere à presença de um único gene de resistência ou mutação conferindo resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos que, no geral, pertencem à mesma classe antimicrobiana. Já a co-seleção deve-se à coexistência de genes distintos ou mutações na mesma cepa bacteriana conferindo resistência a diferentes classes de antimicrobianos (GUARDABASSI & KRUSE, 2010).

Bactérias ambientais e bactérias comensais não patogênicas podem desempenhar importante papel como reservatórios ou veículos de genes de resistência. Genes de resistência podem se propagar rapidamente entre as bactérias, às vezes a outros gêneros de microrganismos e mesmo, se uma bactéria ingerida habitar o intestino por apenas um curto período de tempo, esta é capaz de transferir seus genes de resistência para bactérias patogênicas. Tais permutas causam preocupações quanto à possível propagação de determinantes de resistência aos antimicrobianos de microrganismos comensais de animais e humanos aos patógenos (BOERLIN & WHITE, 2010).

Estudos publicados demonstram que a presença de microrganismos multi-resistentes não estão relacionados somente ao ambiente hospitalar, são encontrados em outros nichos ecológicos, em humanos saudáveis e em ambientes de produção animal (SCHWARZ *et al.*, 2001; WHO, FAO, OIE, 2003; HASMAN *et al.*, 2006; SAINI *et al.*, 2012) nos quais o aparecimento dos mesmos está relacionado à pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos. A preocupação em relação à presença destes elementos no ambiente animal se dá principalmente devido ao risco de transferência destes microrganismos multi-resistentes e seus elementos genéticos para humanos saudáveis através da cadeia alimentar, contato direto com animais, ou ambiente contaminado (Figura 2) (AARESTRUP *et al.*, 2001, WHITE & MCDERMONT, 2001; CASEWELL *et al.*, 2003; TIKOFSKY *et al.*, 2003).

Figura 2 – Interações entre grupos que contribuem na disseminação de bactérias resistentes.



Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, 2008 e McEwen *et al.*, 2009.

São conhecidas duas rotas importantes de transferência de resistência aos antimicrobianos de animais aos seres humanos, uma direta quando bactérias resistentes colonizando animais infectam os seres humanos e outra indireta quando bactérias ou genes de resistência são transferidos horizontalmente à população bacteriana humana a partir da cadeia alimentar (LEENER *et al.*, 2005). Elementos genéticos móveis, em especial plasmídeos e transposons, desempenham papel importante como portadores de genes de resistência nos *Staphylococcus*, uma vez que os mesmos facilitam a transferência horizontal desses genes (WENDLANDT *et al.*, 2013a).

A diversidade de elementos móveis e a emergência de clones bacterianos com resistência múltipla tem se tornado um desafio à saúde pública em consequência da

diminuição de alternativas terapêuticas disponíveis (HASMAN & AARESTRUP, 2004; DAVIS *et al.*, 2004; SOGE *et al.*, 2008). Em 1999, a primeira iniciativa de monitoramento teve início por meio do *Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System* (JVARM), microrganismos zoonóticos (*Campylobacter* e *Salmonella*) e indicadores (*E. coli* e *Enterococcus*) isolados de dejetos de animais saudáveis são continuamente monitorados quanto à resistência. De forma similar, a União Europeia criou programas específicos de vigilância nacional para monitorar o consumo de antimicrobianos e desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e, com a finalidade de padronizar os testes de sensibilidade nos diferentes países europeus, foi criado o projeto Resistência a Antibióticos em bactérias de Origem Animal II (ARBAO-II) focado no monitoramento de agentes zoonóticos e bactérias comensais em bovinos, suínos, aves e alimentos de origem animal (VALOIS *et al.*, 2010). Em 2005, foi aprovado pela Comissão do *Codex Alimentarius* o Código de Práticas para minimizar e Conter a Resistência a Antimicrobianos (CAC/RCP 61-2005) com o objetivo de reduzir os possíveis efeitos que o uso de antimicrobianos em animais de produção possa causar na saúde pública, contendo informações para os médicos veterinários, enfatizando tanto o uso prudente quanto o controle de vendas de antimicrobianos a partir da vigilância instituída em cada país (CODEX ALIMENTARIUS, 2005).

Em 2016, a OIE atualizou a lista de antimicrobianos de importância veterinária, em consonância com a lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017; OIE, 2017), categorizando os antimicrobianos em criticamente importante (CIA), altamente importante (HIA) e importante (AI). Sendo considerados como agentes antimicrobianos CIA em veterinária: aminoglicosídeos, cefalosporinas de terceira geração, macrolídeos, penicilinas, fenicóis, fluoroquinolonas, sulfonamidas (incluindo a combinação com diaminopirimidinas, como a trimetoprima) e tetraciclina; como antimicrobianos HIA: ansamicinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, polimixinas, lincosamidas, fosfomicina e as quinolonas de primeira geração e, como AI ácido fusídico. Tanto a lista da OMS quando da OIE demonstram que muitos agentes antimicrobianos são importantes no tratamento das infecções em humanos e animais. Desta maneira, o desenvolvimento de resistência bacteriana a mais de um desses agentes implica em sérios problemas a saúde pública (WENDLANDT *et al.*, 2015; ARGUDÌN *et al.*, 2017).

No Brasil, a magnitude do problema da resistência a antimicrobianos não é ainda completamente conhecida, mas diversos pesquisadores brasileiros têm evidenciado o grande impacto das infecções causadas por estes patógenos no sistema hospitalar do país (RIBEIRO *et al.*, 2014; PERUGINI *et al.*, 2015).

Frente a isso, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (RM) vinculada à ANVISA em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) foi instituída em 2006 com o objetivo de tornar a assistência à saúde mais efetiva por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção, prevenção e controle da emergência de resistência microbiana em serviços de saúde no país (ANVISA, 2006).

Em alimentos, foi instituído, em 2004, o Programa Nacional da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF), inicialmente proposto para os gêneros *Salmonella* e *Enterococcus* e estendido aos gêneros *Listeria* e *Campylobacter* isolados de carcaças de frango comercializadas no país (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008b). Porém, para derivados do leite, como queijos, não existem monitoramentos implantados pelos órgãos oficiais no que se diz respeito ao controle de resistência a antimicrobianos.

Mesmo que o uso de agentes antimicrobianos na medicina humana, na produção animal e na medicina veterinária não seja responsável pelo surgimento dos genes de resistência a antimicrobianos, há evidências que tem contribuído para a seleção de bactérias resistentes (JENSEN *et al.*, 2010; ÁGURDIN *et al.*, 2017). O uso de antimicrobianos como penicilina, tetraciclina e eritromicina associados à ração animal, como aditivos zootécnicos, podem gerar pressão seletiva resultando em cepas multi-resistentes, que podem ser liberadas no ambiente contribuindo na disseminação dos genes de resistência (BUTAYE *et al.*, 2003). As principais classes de antimicrobianos utilizadas em animais apresentam análogos empregados em humanos e, portanto são capazes de selecionar a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos usados em humanos (BOERLIN & WHITE, 2010). Na Europa o uso de antimicrobianos como promotor de crescimento está proibido desde 2006. Porém, tal condição nem sempre resultou na diminuição consistente do consumo de antimicrobianos, devido ao aumento do uso de antimicrobianos de forma terapêutica (WOOLHOUSE *et al.*, 2015).

O uso de antimicrobianos, assim como biocidas e compostos metálicos na produção animal, em doses sub-terapêuticas e por longos períodos, contribuem para seleção de genes de resistência aos antimicrobianos (ROBINSON *et al.*, 2016;

THANNER *et al.*, 2016). Segundo Yazdankhah *et al.* (2014) a resistência aos compostos de metal tais como, cobre e zinco, comumente utilizados como suplemento alimentar na produção animal é frequentemente associada à resistência a meticilina em estafilococos bem como de macrolídeos e glicopeptídeos em enterococos.

Em *S.aureus*, a disseminação zoonótica de cepas resistentes à meticilina, como a MRSA ST398 (DENIS *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2007) tornou-se uma preocupação em saúde pública. Diversos estudos têm sido conduzidos para elucidar a importância de isolados provenientes tanto de animais quanto de humanos (LYON & SKURRAY, 1987; WERKENTHIN *et al.*, 2001; AARESTRUP & SCHWARZ, 2006; JENSEN & LYON., 2009; SCHWARZ *et al.*, 2011; KADLEC & SCHWARZ, 2012). Segundo Kadlec *et al.* (2012), o gênero *Staphylococcus* pode atuar como doador e receptor de genes de resistência que, na sua maioria estão localizados em elementos genéticos móveis. Sua aquisição se dá a partir de um processo contínuo resultante da interação de *Staphylococcus* com os demais microrganismos. Segundo Wendlandt *et al.* (2013 a) foram detectados mais de 40 diferentes genes de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* isolados em animais, conferindo resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos aprovados para utilização nestas espécies, tais como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, lincosamidas, fenicóis, aminoglicosídeos, pleuromutilinas e diaminopirimidinas.

A crescente disseminação de cepas resistentes é preocupante, pois as opções de tratamento de infecções graves causadas por estas bactérias podem tornar-se limitadas (HAGIHARA *et al.*, 2012). Enfatiza-se a importância do monitoramento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em alimentos, uma vez que, cepas resistentes podem se inserir na cadeia alimentar a partir de alimentos contaminados e transferir genes de resistência às bactérias da microbiota normal ou potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal dos humanos (TEUBER, 1999; WITTE 2000). A alta prevalência de *S. aureus* multirresistente foi relatada em vários estudos com alimentos de origem animal na Europa, Canadá e Estados Unidos (KHANNA *et al.*, 2008; SMITH *et al.* 2011), representando um grande problema na saúde pública (MOROSINI *et al.*, 2006; EL-JAKEE *et al.*, 2011). Arenas *et al.* (2017) relatam a presença de cepas multirresistentes a antimicrobianos em produtos lácteos feitos a partir de leite não pasteurizados assim como, El Seedy *et al.* (2017) destaca a importância à saúde pública da presença de *S. aureus* multiresistente em produtos de origem animal. Os mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência em *S. aureus* incluem:

inativação enzimática (β -lactamase), diminuição da permeabilidade da membrana (resistência a meticilina), mutação do sítio de ligação (resistência a quinolonas) e efluxo ativo de antimicrobianos (ANDERSEN *et al.*, 2015).

a) Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos constituem um grupo de fármacos com presença de um grupamento químico denominado anel β -lactâmico. O mecanismo de ação desta classe ocorre pela inibição da síntese de parede celular bacteriana através da ligação às enzimas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), interferindo com a ligação cruzada do peptidoglicano, que compõe a parede bacteriana, resultando em lise osmótica. Pertencem a este grupo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e os monobactâmicos (VAN HOEK *et al.*, 2011).

A resistência aos β -lactâmicos, em *Staphylococcus* sp. ocorre a partir da inativação enzimática, codificada pelo gene *blaZ* ; ou devido à alteração no alvo da droga conferida pelos genes *mecA* ou *mecC* (WENDLANDT *et al.*, 2013); ou por bombas de efluxo (ORLOVIC *et al.*, 2016).

A resistência das bactérias Gram-positivas à penicilina G, especialmente de *S. aureus*, deve-se principalmente à produção de enzimas β -lactamases, as quais rompem o anel β -lactâmico. *Staphylococcus aureus* secreta enzimas β -lactamases, extracelularmente, como exoenzimas induzíveis. As enzimas β -lactamases produzidas por *S. aureus* são principalmente ativas contra penicilina G, ampicilina e carbenicilina, porém há baixo grau de hidrólise de penicilinas estáveis à penicilinase (meticilina e cloxacilina) e de cefalosporinas (PRESCOTT, 2010).

O gene que confere resistência à penicilina é o *blaZ*, sendo este regulado por dois genes adjacentes o anti-repressor *blaR1* e o repressor *blaI* (RAMMELKAMP & MAXON, 1942). O operon *blaZ-blaI-blaR1* foi identificado no trasposon Tn552 (ROWLAND & DYKE, 1989) detectado tanto em plasmídeos quanto no DNA cromossomal (LYON & SKURRAY, 1987). Este gene foi detectado tanto em *S. aureus* quanto em *Staphylococcus* coagulase negativa isolado de diferentes espécies animais (VESTERHOLM-NIELSEN, 1999; YAZDANKHAH *et al.*, 2000; AARESTRUP & JENSEN, 2002; HAVERI *et al.*, 2005; OLSEN *et al.*, 2006; SAWANT *et al.*, 2009). Estão presente na maioria dos isolados de *S.aureus* provenientes de bovinos (FEBLER

et al., 2010), aves (MONECKE *et al.*, 2013) e suínos (KADLEC *et al.*, 2009; ARGUDIN *et al.*, 2011; OVERESCH *et al.*, 2011).

Quando um isolado de *S. aureus* suscetível a meticilina (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* - MSSA) adquire o cassete cromossômico de resistência, SCCmec, passa a ser um MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Os SCCmec são elementos genéticos móveis que possuem dois componentes principais: o complexo gênico *mec*, que contém o gene *mecA*, conferindo resistência à β -lactâmicos e o complexo gênico *ccr*, que codifica recombinases sítio-específicas para o movimento do cassete (KURODA *et al.*, 2001). Os SCCmec têm sido identificados em *S. aureus* e transmitido entre as espécies de *Staphylococcus*. Atualmente são conhecidos onze tipo de SCCmec (I a XI) (TURLEJ *et al.*, 2011). Muitos estudos detectaram SCCmec em *Staphylococcus* isolados em animais (CUNY *et al.*, 2010; LOEFFLER & LOYD, 2010; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2010b; WEESE, 2010; GRAVELAND *et al.*, 2011; FITZGERALD, 2012; FLUIT, 2012; PANTOSTI, 2012).

A detecção do gene *mecA* é considerada padrão ouro para determinação da resistência à meticilina (LEE *et al.*, 2004), sendo que, a presença do mesmo pode tornar esta bactéria resistente a penicilinas e cefalosporinas (ARIAS, 2012). Segundo o CLSI (2016), *Staphylococcus* spp. que carregam o gene *mecA* devem ser considerados resistentes a toda a classe dos β -lactâmicos. A base molecular dessa resistência é a síntese de proteínas de ligação à penicilina (PBPs), como a PBP2a, que tem baixa afinidade para β -lactâmicos (STAPLETON & TAYLOR, 2002; SILVA, 2008; ISHIHARA *et al.*, 2010). A PBP2a funciona como alvo alternativo resistente à inibição pelo antimicrobiano permitindo a formação da camada peptidoglicana na parede celular (RIVERA-TAPIA, 2003). Ao contrário do que se pensava, a resistência à meticilina não é conferida somente pelo gene *mecA*, mas também por seus homólogos, já conhecidos, *mecB* e *mecC*. Inicialmente considerado como um gene ancestral do *mecA*, o *mecB* foi identificado em *Macrococcus caseolyticus* por Baba *et al.* (2009). Embora, o mesmo, ainda não tenha sido detectado em *Staphylococcus*, Becker *et al.* (2014), destacam a importância do *Macrococcus caseolyticus* como reservatório deste gene e alertam quanto ao risco potencial de transmissão pelo fato destes microrganismos pertencerem à mesma família *Staphylococcaceae* e compartilharem habitats em comum. Além de, *mecB* estar localizado em diferentes MGEs, incluindo plasmídeos, elementos genéticos que apresentam maior mobilidade do que SCCmec (HIRAMATSU *et al.*, 2013). A descoberta de mais um gene homólogo *mecC* em *S. aureus* e outras espécies, em 2011,

demonstrou a existência de vários genes que podem codificar resistência à meticilina, ampliando a diversidade da família SCC (HARRISON *et al.*, 2013; LONCARIC *et al.*, 2013; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2015). Este gene tem sido associado principalmente a linhagens de *S. aureus* relacionadas a infecções e colonização em animais (BECKER *et al.*, 2014). Geralmente, há uma baixa ocorrência de isolados humanos *mecC*-positivos (DEPLANO *et al.*, 2010). Tanto *mecA* quanto *mecC* localizam-se no complexo genético móvel SCC*mec* (SHORE *et al.*, 2011).

Muitos estudos detectaram *mecA* em vários SCC*mec* de *Staphylococcus* isolados em animais (CUNY *et al.*, 2010; LOEFFLER & LOYD, 2010; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2010b; WEESE, 2010; GRAVELAND *et al.*, 2011; FITZGERALD, 2012; FLUIT, 2012; PANTOSTI, 2012).

MRSA tem se apresentado como importante patógeno na infecção hospitalar humana. Este problema se limitava anteriormente ao ambiente hospitalar, no entanto o MRSA tem se disseminado na população humana (WHITE & BOERLIN, 2010; ORLOVIC *et al.*, 2016). Infecções por MRSA acarretam maior mortalidade (HAGIHARA *et al.*, 2012), maior tempo de hospitalização e aumento nos custos quando comparados a infecções por MSSA e a dificuldade em tratar com sucesso algumas infecções por MRSA os caracteriza como microrganismos altamente virulentos e patogênicos (RUDKIN *et al.*, 2012). Embora a origem do MRSA não seja totalmente compreendida, suspeita-se que *S. aureus* suscetível à meticilina (MSSA) tenha adquirido o gene *mecA* através de transferência horizontal de estafilococos coagulase-negativos (WU *et al.*, 1996; WIELDERS *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina são reconhecidamente um dos principais patógenos envolvidos em infecção hospitalar em medicina humana (TACCONELLI *et al.*, 2008) e animal (DIAS, 2010; WEESE *et al.*, 2010). De acordo com Wesse *et al.*, 2005; Nienhoff *et al.*, 2009 e Ishihara *et al.* (2010) o contato do homem com animais infectados com MRSA representa fator de risco para infecção tendo em vista que clones de MRSA foram encontrados concomitantemente em animais de companhia e, em humanos saudáveis e hospitalizados (O'MAHONY *et al.*, 2005; RANKIN., 2005; WITTE *et al.*, 2007; DENIS *et al.*, 2009). Vários autores denotam a importância do risco ocupacional para médicos veterinários devido ao contato com animais portadores de cepas resistentes (HANSELMAN *et al.*, 2006; WITTE *et al.*, 2007; MOODLEY *et al.*, 2008; CUNY *et al.*, 2009; NIENHOFF *et al.*, 2009; WULF *et*

al., 2009; DENIS *et al.*, 2009; MULDER *et al.*, 2010; HUBER *et al.*, 2011; GARCIA-GRAELLS *et al.*, 2012; MORCILLO *et al.*, 2012).

A frequência de infecções ocasionadas por MRSA tem apresentado crescimento contínuo em instituições hospitalares a nível mundial (BURKE, 2003; COHEN *et al.*, 2008; DE LENCASTRE *et al.*, 2007). Na Dinamarca, infecções por MRSA são sistematicamente reportadas por médicos e generalistas ao *Statens Serum Institut* (SSI) desde 1986. Estes dados, no entanto, reforçam a importância da comunicação dos casos em território nacional de forma a favorecer a adoção precoce de medidas considerando-se que a prevalência deste microrganismo no país não é conhecida (EVANGELISTA & OLIVEIRA, 2015). Segundo Ferreira *et al.* (2009) estudos no Brasil revelam diferentes frequências desse patógeno tanto de origem hospitalar quanto comunitária; no Rio Grande do Sul, Spiandorello *et al.* (2000) detectaram-se 32,7% de isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina em pacientes internados em Caxias do Sul, já na comunidade Menegotto & Picoli (2007) observaram-se 7,5% de CA-MRSA. Em Recife, Cavalcanti *et al.* (2006) identificaram a taxa de prevalência de 13% desta bactéria em amostras de pacientes de UTI. Na Bahia, em Salvador, Brittes *et al.* (2006) relataram de prevalência de 28% de MRSA assim como, Silva & Porcy (2016) relataram a frequência de 40% de MRSA no Hospital de Emergência em Macapá no Amapá. Em São Paulo o sistema de vigilância de infecções hospitalares do Centro de Vigilância Epidemiológica (2015) revelou a presença de *S. aureus* em 14% das hemoculturas colhidas nas unidades de tratamento intensivo, destas 67% eram MRSA.

Enquanto os HA-MRSA carregam SCCmec dos tipos I a III, os CA-MRSA estão mais associados aos tipos IV e V. Esses são elementos genéticos menores e com maior mobilidade que os outros tipos. Esses carregam um menor número de genes determinantes de resistência do que os tipos II e III. Por isso, os CA-MRSA caracteristicamente tendem a ser menos multirresistentes que os HA-MRSA (RICE, 2006; MÍMICA & MENDES, 2007, TORRES, 2010). Outra característica importante do CA-MRSA é a presença dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL), uma toxina capaz de induzir a lise de leucócitos humanos e causar dano tecidual, sendo considerada fator de virulência associado a quadros de pneumonias necróticas e infecções de pele severas (SANTOS *et al.*, 2007). O aumento da infecção por MRSA em animais a partir de reservatórios humanos é um problema crescente. Linhagens clonais de MRSA (ST398) têm sido isolados tanto de infecções em suínos quanto de humanos em contato com esses animais (VAN DÜJKEREN *et al.*,

2007; SCHWARZ *et al.*, 2008; KADLEC *et al.*, 2009; MEENKEN *et al.*, 2010). Embora se pensasse que o clone ST398 fosse proveniente de animais, sendo referido como MRSA associado à pecuária (LA-MRSA), estudos sugerem que o mesmo tenha se originado em humanos a partir de MSSA (NEMATI *et al.*, 2008; PRICE *et al.*, 2012). No entanto, estudos comprovam que estas cepas não são restritas somente a esta espécie, pois foram encontradas em cães e equinos (DENIS *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2007).

O primeiro surto de MRSA ST398 foi relatado em um hospital na Holanda em 2007 (WULF *et al.*, 2007), caracterizando seu potencial zoonótico de propagação. A identificação de STs específicos em aves, bovinos e equinos, idênticos ou semelhantes aos STs encontrados em humanos implica que a transferência de *S. aureus* entre diferentes espécies de animais pode ocorrer (ARMAND-LEFEVRE *et al.*, 2005; VOSS *et al.*, 2005; VAN LOO *et al.*, 2007; LOWDER *et al.*, 2009; RASIGADE *et al.*, 2010; GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2011; SAKWINSKA *et al.*, 2011).

A presença de MRSA em alimentos de origem animal é investigada em diversos estudos (VAN LOO *et al.*, 2007; DE BOER *et al.*, 2009; LOZANO *et al.*, 2009; FEBLER *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2010; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2010; WEESE *et al.*, 2010; ARGUDIN *et al.*, 2011; DE JONGE *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2011; AGERSO *et al.*, 2012; FEBLER *et al.*, 2012; FLUIT, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2012; CARFORA *et al.*, 2015; AVSAROGLU *et al.*, 2016) e, de acordo com Wang Xin *et al.* (2014) embora os mesmos comprovem que a prevalência de MRSA seja baixa em alimentos, sua ocorrência representa uma ameaça potencial para os consumidores e enfatiza a necessidade de um melhor controle das fontes de contaminação. Em 1995, foi descrito um surto de MRSA de origem alimentar que causou a morte de cinco pessoas na Itália, no qual MRSA foi identificado em 3,75% das amostras de leite bovino e queijo (NORMANNO *et al.*, 2007). Cerqueira e Almeida (2013) destacaram a importância em demonstrar a presença de MRSA em alimentos de origem animal com o objetivo de despertar o alerta às autoridades de saúde pública e da agropecuária sobre a necessidade de acompanhamento da adoção de práticas e medidas de controle, tanto no manejo de animais, como em toda a cadeia produtiva de alimentos. O primeiro relato de MRSA em alimento no Brasil, foi realizado por Hachiya *et al.* (2016) em queijo mole (“requeijão”).

Staphylococcus sp. compreende o principal gênero envolvido em casos de mastite subclínica em rebanhos leiteiros (PYÖRÄLÄ & TAPONEN, 2009; LUINI *et*

al., 2015) e os *S. aureus* assumem destacada importância como agente de mastite (COSTA, 2008; BANDOSH & MELO, 2011; BEN SAID *et al.*, 2016), pois, além de perdas econômicas, esta espécie bacteriana representa risco à saúde pública pela capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis (LAMAIA *et al.*, 2005; VIÇOSA *et al.*, 2010; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014) e resistência a antimicrobianos (RICH *et al.*, 2005; BEN SAID *et al.*, 2016).

No ambiente de produção leiteira os microrganismos são constantemente submetidos à pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos no rebanho (ACAR & MOULIN, 2006; SILBERGELD *et al.*, 2008) desta maneira, é importante a identificação dos fatores que contribuem nesta disseminação de cepas resistentes no ambiente de produção leiteira não somente por razões clínicas mas também de saúde pública (SAINI *et al.*, 2012). Segundo Kreausukon *et al.* (2012) a presença de cepas MRSA no rebanho leiteiro requer atenção principalmente em três aspectos: primeiro ao risco de colonização ou infecção dos trabalhadores devido a exposição ao patógeno (JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007; SPOHR *et al.*, 2011); segundo aspecto é o leite como via de transmissão de MRSA para pessoas que consomem leite cru ou como fonte de contaminação inicial na cadeia produtiva de lácteos. Cabe ressaltar que o consumo de leite cru é comum entre os agricultores (OLIVER *et al.*, 2009). O terceiro aspecto é a saúde animal uma vez que, em casos de mastite clínica contagiosa a resistência destas cepas frente aos β -lactâmicos reduz as opções terapêuticas, resultando no aumento das taxas de descarte no rebanho. De acordo com Sasidharan *et al.* (2011) são considerados pontos críticos na contaminação de produtos lácteos a ordenha, o armazenamento, manuseio e o transporte dos mesmos.

Apesar da importância de *S. aureus* como causador de mastite e da pressão seletiva exercida por cloxacilina e oxacilina no seu tratamento, estudos confirmam a baixa frequência de cepas MRSA em rebanhos leiteiros (HARAN *et al.*, 2012. VAN DUIJKEREN *et al.*, 2014; TENHAGEN *et al.*, 2014; LUINI *et al.*, 2015).

O primeiro MRSA isolado de mastite bovina foi relatado em 1975 em estudo realizado por Devriese e Hommez (1975) no qual detectaram 68 MRSA a partir de 20 rebanhos leiteiros na Bélgica. No Brasil, Dias *et al.* (2011) e Vyletelová *et al.* (2011) detectaram a presença de MRSA em 11% e, 1,7% das amostras de leite analisadas, respectivamente. Na Servia, Zutic *et al.* (2012) avaliaram leite de 212 bovinos apresentando mastite subclínica e confirmaram a presença de MRSA em 14,28% destas amostras. Na Bélgica, Vanderhaeghen *et al.* (2010) detectaram 11 MRSA (9,3%) em 118

S. aureus a partir de leite bovino, os mesmos pertenciam ao ST398 e SCCmec do tipo IV e V. No entanto, poucos estudos foram conduzidos à detecção de MRSA a partir de produtos lácteos, incluindo o queijo feito a partir de leite pasteurizado. Normanno *et al.* (2007), na Itália, isolaram MRSA em 1,3% dos produtos lácteos. Rodríguez-Lázaro *et al.* (2015) investigaram 195 amostras de diferentes alimentos confiscados de passageiros que viajavam para os EUA, onde identificaram MRSA em 9,1% das amostras (um queijo). Em outro estudo, Basanisi *et al.* (2017) relataram que 8,3% das cepas de *S. aureus* isoladas de leite e produtos lácteos eram MRSA. No Brasil enquanto Silveira-Filho *et al.* (2014), estudando leite e produtos lácteos, não encontraram MRSA, Gonzalez *et al.* (2017) detectaram 7 cepas MRSA em queijos minas frescal.

b) Resistência aos glicopeptídeos

Representantes deste grupo, a teicoplanina e a vancomicina, são comumente utilizados na terapia das infecções causadas por *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas (LOPES *et al.*, 2009). A vancomicina é o antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento de infecções por MRSA, bem como para infecções graves por cocos Gram-positivos, em pacientes hospitalizados, agindo por inibição da síntese da parede celular bacteriana. Porém, seu emprego apresenta algumas limitações tais como: ação bactericida menor do que β -lactâmicos, pouco poder de penetração intracelular, falta de atividade contra organismos que formam biofilme e falta de interferência com a produção de toxinas (HAGIHARA *et al.*, 2012). Para atuar na célula bacteriana, os glicopeptídeos precisam se ligar ao terminal D-alanil-D-alanina da molécula de peptídeoglicano. O mecanismo de resistência resulta na substituição do peptídeo final do terminal D-alanil-D-alanina para D-alanil-D-lactato, cuja afinidade reduzida à vancomicina não resulta em prejuízos para a síntese da parede celular bacteriana (CHANG *et al.* 2015).

O primeiro isolado clínico de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos foi descrito no Japão, em 1996 (Hiramatsu *et al.*, 1997). Assim como, Bassetti *et al.* (2013) descreveram, também no Japão, outras cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (*Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* - VISA). Após esta notificação, este fenótipo foi relatado também em outros países, inclusive no Brasil (MÉGIA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ASKARI *et al.* 2013; BASSETTI *et al.* 2013; ZHANG *et al.*, 2015; SAKAI *et al.* 2016). Fatores como

a colonização por MRSA, infecções causadas por enterococos resistentes à vancomicina e longos períodos de tratamento contribuem para o desenvolvimento de resistência frente a este antimicrobiano (DHAND & SAKOULAS, 2012).

De acordo com o CLSI, cepas de *S. aureus* submetidas ao teste de determinação de CIM, que forem resistentes a concentrações de 4-8 µg/mL de vancomicina são consideradas cepas VISA e aquelas resistentes a concentrações iguais ou superiores a 8µg/mL, são cepas resistentes (*Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus* – VRSA) (SAKAI *et al.* 2016). A resistência de *S. aureus* à vancomicina foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos (2002) pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (CHANG *et al.*, 2003).

A resistência à vancomicina está relacionada à aquisição de um plasmídeo contendo o gene *vanA*, originado de *Enterococcus faecalis*. A constatação de transferência de resistência à vancomicina de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) para MRSA, entre dois pacientes humanos nos EUA ressaltou o risco potencial de coexistência de portador de ambos os patógenos (CHANG *et al.*, 2003). Há crescente preocupação quanto à possibilidade de animais de companhia e de produção serem fontes de *Enterococcus* altamente resistentes (HERSHBERGER *et al.*, 2005; GUARDABASSI *et al.*, 2004). Há, porém, outros genes de resistência à vancomicina (*vanB* e *vanC*) já identificados (MIROVIC, 2003).

Lee (2003) em estudo conduzido em 421 *S. aureus* isolados de animais de produção, incluindo bovinos de corte e de leite, suínos e frangos, detectou 15 MRSA. Destes, 12 foram isolados no leite e os demais em frangos. Sendo que, 100% dos *S. aureus* eram susceptíveis a vancomicina. Na Turquia, foi avaliada a resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterococcus* sp. (n = 4), *Staphylococcus* coagulase negativa (n = 22) e *S. aureus* (n = 4) isoladas a partir de 50 amostras de carne de frango, nas quais foram observada resistência a vancomicina em 50%, 73,3% e em nenhum isolado, respectivamente (YURDAKUL *et al.*, 2013). Na Espanha, Agurdín *et al.* (2012) observaram que 100% (n = 64) dos *S. aureus* isolados de alimentos e manipuladores eram susceptíveis a vancomicina. A mesma observação foi relatada por Xu *et al.* (2014) em 78 *S. aureus* isolados a partir do leite, carne, vegetais e alimentos congelados na China. Em vários estudos conduzidos em diferentes partes do mundo, não foi observada resistência à vancomicina em cepas de *S. aureus* isolados de queijos (NORMANNO *et al.*, 2007; ANDRE *et al.*, 2008; BARTOLOMED *et al.*, 2009; CAN & CELIK, 2012; AREFI *et al.*, 2014; SPANU *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016).

c) Resistência aos aminoglicosídeos

A classe dos aminoglicosídeos incluem antimicrobianos de extrema importância para saúde humana, tais como: amicacina, arbecacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e estreptomicina, drogas comumente empregadas no tratamento de endocardite enterocócica e tuberculose resistente a múltiplas drogas. No entanto, a terapia prolongada com aminoglicosídeos pode provocar insuficiência renal e danos no oitavo nervo, devido ao efeito tóxico que estes antimicrobianos exercem, limitando muitas vezes a sua utilização às infecções graves (COLLIGNON *et al.*, 2010).

Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por interferirem na síntese proteica devido à ligação à porção 16S da subunidade ribossomal 30S (HERNÁNDEZ, 1998), impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e a síntese proteica correspondente (BECKER & COOPER, 2013). Os mecanismos de resistência já descritos a este grupo incluem: sistemas de efluxo, mutações ribossômicas e inativação da droga por enzimas, sendo este último mecanismo o principal, existindo mais de 50 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos descritas e classificadas como N-acetiltransferases (AAC), O-adeniltransferases e O-fosfotransferases (APH) (VAN HOEK *et al.*, 2011; BECKER & COOPER., 2015).

Nos *Staphylococcus*, a resistência frente os aminoglicosídeos ocorre a partir da inativação enzimática (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010) mediada até o momento pelos seguintes genes: *aacA-aphD*, confere resistência à gentamicina, canamicina, tobramicina e amicacina; *aadD*, confere resistência à canamicina, neomicina e tobramicina; *aphA3*, media resistência à canamicina, neomicina e amicacina; *aadE* e *str*, ambos conferem resistência a estreptomicina (WENDLANDT *et al.*, 2013; ÁRGUDIN *et al.*, 2017). Tanto o gene *aacA-aphD* quanto os genes *aadD*, *aphA3* e *str* foram detectados em *S. aureus*, principalmente resistentes à meticilina em isolados de suínos (SCHWARZ *et al.*, 2008; KADLEC *et al.*, 2009; ARGUDÍN *et al.*, 2011; OVERESH *et al.*, 2011) e bovinos (TORUKOGLU *et al.*, 2009; FEBLER *et al.*, 2010b; ALBA *et al.*, 2015).

Xu *et al.* (2014) analisaram o perfil de resistência de 78 cepas de *S. aureus* de alimentos nas quais observaram fenótipo de resistência a aminoglicosídeos em 12,8% dos isolados e, os genes *aac6'* ou *aph2''* foram detectados em 35,9% das cepas. Argudín *et al.* (2012) em estudo conduzido em 64 *S. aureus* isolados de alimentos e manipuladores, relataram 6,5% de resistência frente a amicacina, gentamicina e

tobramicina. Sakwiska *et al.* (2011) observaram resistência a gentamicina em 0,6% (2/343) de *S. aureus* isolados no leite oriundos de fazendas leiteiras da Suíça e França. Diferentes estudos conduzidos com cepas *S. aureus* de queijos não foi observada resistência a gentamicina (ANDRE *et al.*, 2008; AREFI *et al.*, 2014; KUREKCI *et al.*, 2016 GONZALEZ *et al.*, 2017, GONZALEZ *et al.*, 2017).

d) Resistência aos macrolídeos

Os representantes deste grupo são a eritromicina, claritromicina, roxitromicina e a azitromicina, antimicrobianos que apresentam efeito bacteriostático sobre os microrganismos e que, em alguns casos, quando utilizados em concentrações elevadas ou em contato com microrganismos muito suscetíveis, apresentam efeito bactericida (FLUIT *et al.*, 2001). Para *S. aureus* são descritos dois mecanismos de resistência a esta classe, efluxo ativo mediado pelos genes *mef(A)* e *msr(A)* e a inativação enzimática mediada pelo gene *mph(C)* (WENDLANDT *et al.*, 2013; ARGUDÍN *et al.*, 2015).

Macrolídeos, lincosamidas, e estreptogramina do grupo B são grupos de antibióticos chamados de MLSb (ADALETI, 2010; COUTINHO *et al.* 2010; SEIFI *et al.* 2012). Estas são drogas quimicamente distintas, entretanto, apresentam mecanismo de ação similar na inibição da síntese proteica, pela ligação ao receptor 23s do rRNA, que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano. A resistência de *S. aureus* ao grupo MLSb é conhecida desde 1956, logo após a introdução da eritromicina na prática terapêutica (AMORIM *et al.*, 2009).

Dentre as opções de lincosamídeos (lincomicina e clindamicina) a clindamicina é a droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à eritromicina, devido às suas propriedades farmacocinéticas, além de representar uma alternativa para pacientes alérgicos à penicilina (YLMAZ *et al.* 2007; AMORIM *et al.* 2009; MAJHI *et al.* 2016). A eritromicina foi o primeiro medicamento da classe dos macrolídeos introduzido na clínica, sendo observadas cepas resistentes, por volta de 1953, após o primeiro ano do início de seu uso, na Europa, Japão e EUA (COUTINHO *et al.* 2010). As estreptograminas são formadas pela estreptogramina tipo A (pristinamicina) e tipo B (dalfopristina e quinupristina combinadas), que atuam sinergicamente na inibição da síntese proteica bacteriana, representando uma opção terapêutica para cepas de MRSA (SOUZA *et al.* 2009).

A expressão do fenótipo de resistência ao grupo MLSb pode ser induzível (iMLSb) ou constitutiva (cMLSb). No tipo induzível ocorre a transcrição do mRNA inativo na presença de um indutor e após ativado há produção de metilases. Os genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* – *erythromycin ribosome methylase*) codificam metilases que irão conferir resistência aos MLSb pela metilação do resíduo A2058, localizado no domínio V conservado do RNA ribossomal 23S o que leva à redução da ligação do agente antimicrobiano ao ribossomo. Já na resistência constitutiva não há necessidade da presença de um indutor para que o mRNA relativo à metilase seja ativado, sendo nesse caso os isolados resistentes à todas as lincosaminas, macrolídeos e estreptograminas tipo B. Somente os macrolídeos que possuem 14 e 15 átomos atuam como indutores efetivos na síntese das metilases, como é o caso da eritromicina (MAJHI *et al.* 2016). O fenótipo de resistência MLSb pode ser identificado pelo teste D realizado concomitantemente ao antibiograma pelo método de disco-difusão em placa (SEIFI *et al.* 2012; HATKAR *et al.* 2014, CLSI 2016; MAJHI *et al.* 2016).

Agurdín *et al.* (2012) observaram fenótipos de resistência a eritromicina e clindamicina em 25,8% e 19,4% das cepas de *S. aureus* (n = 31) isoladas a partir de alimentos e manipuladores. Os genes *ermC* ou *ermA* e *ermC* foram detectados em três e duas cepas, respectivamente. Enquanto *msrB* observado em uma das cepas e *msrA* e *msrB* em duas cepas. Xu *et al.* (2014) em estudo realizado em Shangai, China, observaram que 59% e 44,9% das cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos apresentavam fenótipos de resistência a eritromicina e clindamicina, respectivamente. El Seedy *et al.* (2017) observaram resistência em 26,3% das cepas de *S. aureus* isoladas em carne e leite no Egito. Entorf *et al.* (2014) investigaram o perfil de susceptibilidade a tilosina e eritromicina de 112 *S. aureus* isolados de mastite bovina e observaram que 10,71% apresentavam resistência a eritromicina. Entre estes, apenas um não apresentou o fenótipo de resistência MLSb e, os genes *msr(A)* ou *mph(C)* foram detectados em nove destes isolados de *S. aureus*. No Canadá, estudo conduzido por Saini *et al.* (2012) em 526 *S. aureus* isolados de infecções intramamárias de bovinos apresentando mastite clínica e subclínica, foi detectada 5% de resistência a eritromicina. Na Alemanha Kreasukon *et al.* (2012) observaram respectivamente, 58% e 52% de resistência a clindamicina e eritromicina em 36 MRSA isolados em tanques de leite. A partir do leite e produtos lácteos, Jamali *et al.* (2015) verificaram resistência a lincomicina, clindamicina e eritromicina em 11,9%, 11,3% e 7,9%, respectivamente, em 328 cepas de *S. aureus*. Gonzalez *et al.* (2017) verificaram 67,74% e 12,9% de resistência a

eritromicina e a clindamicina em 31 cepas de *S. aureus* isoladas a partir de queijos minas frescal. A partir de *S. aureus* isolados em queijos Rola *et al.* (2016) e Arefi *et al.* (2014) observaram fenótipo de resistência a eritromicina em 1,2% (1/122) e 12% (3/25), consecutivamente.

e) Resistência às fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas, também conhecidas como quinolonas, 4-quinolonas, ácidos piridina- β -carboxílicos e ácidos carboxílicos quinolonas, formam um grupo amplo de antimicrobianos sintéticos. A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, em 1962, e no período entre meados de 1960 e início de 1980 várias outras quinolonas foram aprovadas para o uso clínico (WALKER & DOWLING, 2010). As fluoroquinolonas interferem na síntese do DNA bacteriano pela inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, que atuam no processo de replicação do DNA (LAPONGV *et al.*, 2009). A DNA girase é composta por duas subunidades *GyrA* e *GyrB*, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente (FUKUDA *et al.*, 2001; MARURI *et al.*, 2012) enquanto a topoisomerase IV é composta por quatro subunidades homólogas, duas *ParC* (*GrlA* em *S. aureus*) e *ParE* (*GrlB* em *S. aureus*) codificadas pelos genes *parC* e *parE* (ZECHIEDRICH & CAZZARELLI, 1995; NITISS, 2009). De acordo com Segreti *et al.* (2012) algumas fluoroquinolonas tais como ciprofloxacina e fleroxacina, quando em altas concentrações atuam na membrana celular bacteriana desintegrando-a.

A primeira fluorquinolona aprovada para uso em medicina humana foi o norfloxacina, seguido pelo ciprofloxacina; em medicina veterinária a primeira fluorquinolona aprovada para uso em animais foi o enrofloxacina nos EUA em 1988, comumente utilizada para tratar infecções causadas por diversos agentes patogênicos bacterianos, incluindo MRSA e MSSA tanto em animais de companhia quanto em animais de produção (HAUSCHILD *et al.*, 2012). Existem oito fluorquinolonas aprovadas para o uso em medicina veterinária: danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, orbifloxacino, sarafloxacino e o ibafloxacino e pradofloxacino (ambos apenas na Europa). Estas fluorquinolonas atualmente comercializadas para o uso em medicina veterinária são tipicamente bem absorvidas após a administração oral, apresentam grande volume de distribuição, penetram praticamente em todas as células e tecidos do organismo e tem meia-vida de eliminação

longa, possibilitando a administração do medicamento em intervalos de 24 ou 48 horas (WALKER & DOWLING, 2010).

A resistência às fluorquinolonas pode ser mediada por mutações cromossômicas em genes codificadores, pela redução da concentração intracitoplasmática de quinolonas e por genes de resistência carregados por plasmídeos (*qnr*, *aac(6')*Ib-cr, *qepA* e *oqxAB*) (ÁLVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2015). Em *Staphylococcus* e *Streptococcus* a resistência é mediada principalmente por alterações no sítio de interação da droga e/ou pela diminuição do acúmulo intracelular através do efluxo deste agente (OYAMADA *et al.*, 2006, HAUSCHILD *et al.*, 2012).

Em cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos por El Bayomi *et al.* (2016), Xu *et al.* (2014) e Yucel *et al.* (2011) foi observado fenótipo de resistência a ciprofloxacina em 33,3%, 34,6% e 1,4%, respectivamente; enquanto, Agurdín *et al.* (2012) observaram susceptibilidade a ciprofloxacina em 31 cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos. Em 78 cepas de *S. aureus* Xu *et al.* (2014) detectaram genes de resistência a fluoroquinolonas, *gyrA*, *grrA* e *norA*, em 14,1%, 38,5% e 100% dos isolados, respectivamente.

f) Resistência à tetraciclina

As tetraciclinas são antimicrobianos de amplo espectro, bacteriostáticos que inibem a síntese proteica nos microrganismos sensíveis. São comumente utilizados nas terapias humanas, na medicina veterinária e na agricultura (CHOPRA & ROBERTS, 2001; CAUWERTS *et al.*, 2007; NEELA *et al.*, 2009). Após a difusão através da membrana celular externa, um processo ativo mediado por carreador transporta as drogas através da membrana citoplasmática interna e uma vez nas células, as tetraciclinas se ligam reversivelmente aos receptores da subunidade 30S do ribossomo bacteriano, onde interferem com a ligação do RNA aminoacil-transportador ao complexo ácido ribonucleico (GIGUÉRE, 2010).

A resistência adquirida às tetraciclinas encontra-se disseminada entre as bactérias e micoplasmas o que tem reduzido consideravelmente a utilidade destes antimicrobianos. A maioria dos microrganismos resistentes à tetraciclina transporta um ou mais dos 40 genes de resistência às tetraciclinas (CAUWERTS *et al.*, 2006; KAZIMIERCZAK *et al.*, 2009) presentes frequentemente em elementos transferíveis como plasmídeos, transposons, transposons conjugativos e/ou integrons

(BOGUSLAWSKA *et al.*, 2009). Segundo Giguère (2010), a resistência às tetraciclinas pode ser mediada por um dos três diferentes mecanismos: efluxo de tetraciclina dependente de energia por meio de transferência proteica transmembrana que resulta em menor concentração do antimicrobiano no citosol (considerado o mais comum); proteção ribossômica na qual as tetraciclinas não mais se ligam produtivamente ao ribossomo bacteriano; ou devido à modificação química enzimática que requer oxigênio, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e catalase. Até o momento foram identificadas oito classes de genes envolvidos na resistência codificada por proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo do antimicrobiano através da membrana celular, sendo as classes K e L encontradas nos microrganismos Gram-positivos, pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

A resistência à tetraciclina em *Staphylococcus* isolados em animais é frequentemente mediada pelos genes *tet(K)* e *tet(L)* que codificam mecanismo de efluxo. Estes genes geralmente localizam-se em plasmídeos sendo que, os plasmídeos carreadores de *tet(k)* semelhantes ao pT181 (4.4 Kb) (KHAN & NOVICK, 1983) raramente carregam genes adicionais de resistência e os carreadores de *tet(L)* com tamanho entre 5,5-40 Kb abrigam um ou mais genes de resistência (SCHWARZ *et al.*, 1992, 1996; KADLEC & SCHWARZ, 2010). Estes plasmídeos já foram encontrados em MRSA-LA especialmente no ST398 (KADLEC *et al.*, 2009; KADLEC & SCHWARZ, 2009, 2010; FEBLER *et al.*, 2010). Já os genes *tet(M)* e *tet(O)* mediam resistência às tetraciclinas a partir de proteção ribossômica. *tet(M)* está comumente envolvido na resistência de *S. intermedius* e *S. pseudintermedius* (SCHWARZ & WANG, 1993; SCHWARZ *et al.*, 1998; KADLEC *et al.*, 2010b; PERRETEN *et al.*, 2010; KADLEC & SCHWARZ, 2012). *tet(O)* até o momento, foi detectado em *S. intermedius*, em *S. xylosus* juntamente com gene *tet(L)* (WENDLANDT *et al.*, 2013) e, em um isolado de *S. aureus* em associação à *tet(K)* e *tet(M)* (MARTINI *et al.*, 2017). Os genes *tet(K)*, *tet(L)* e *tet(M)* foram detectados simultaneamente em isolados de MRSA-LA oriundos de suínos, bovinos e aves (KADLEC *et al.*, 2009; FEBLER *et al.*, 2010b; ARGUDÍN *et al.*, 2011; MONECK *et al.*, 2013). Martini *et al.* (2017) observaram que 90% (81/90) de *S. aureus* isolados no leite amplificaram a pelo menos um dos genes de resistência a tetraciclina sendo, o mais frequente *tet(K)* (84%) seguido de *tet(L)* (9%), *tet(M)* (2,2%) e *tet(O)* (1,1%). Destes 71% apresentaram fenótipo de resistência a tetraciclina.

Yucel *et al.* (2011) compararam os perfis de resistência de *S. aureus* isolados em amostras clínicas humanas e de alimentos (frango, leite e queijos) nos quais, observaram resistência a tetraciclina em 56,3% (169/300) e 9,5% (27/284) dos isolados, respectivamente. Em 19 *S. aureus* isolados a partir de alimentos (carne e leite) El Seedy *et al.* (2017) observaram 57,8% de resistência a tetraciclina, resultado semelhante ao observado por El Bayomi *et al.* (2016) em alimentos a base de frango (56,7%). Fenótipos de resistência a tetraciclina em *S. aureus* isolados de leite e derivados foram observados em 100%, 56,1% e 8,8 % das cepas estudadas por Kreasukon *et al.* (2012), Jamali *et al.* (2015) e Saini *et al.* (2012), respectivamente.

2.2.4.1.3 Epidemiologia molecular de *S. aureus*

Clones de *S. aureus* multirresistentes tem ampla distribuição e, nesse contexto, técnicas de biologia molecular (genotipagem) têm sido utilizadas como ferramentas na diferenciação de isolados com fenótipos idênticos. A genotipagem ganhou importância devido à necessidade de empregar técnicas eficazes para determinação da origem dos agentes patogênicos com alta taxa de virulência, transmissibilidade e resistência a antimicrobianos, como é o caso dos *S. aureus*. Essas técnicas têm se revelado uma ferramenta muito útil para estudos epidemiológicos, uma vez que permitem a determinação das relações clonais entre os isolados (SHOPSIN *et al.*, 2000; ALVEZ *et al.*, 2009; CASTELANI *et al.*, 2013; WENDLANDT *et al.*, 2013b). Os resultados de genotipagem fornecem informações úteis para a compreensão da distribuição mundial ou local dos clones, na denominada epidemiologia molecular (RAHIMI *et al.* 2016, SAKAI *et al.* 2016). A tipificação de *S. aureus* tornou-se útil para determinar a origem da cepa (humana ou animal), em vários produtos alimentares, na indústria de alimentos e também para investigação epidemiológica de surtos de intoxicação alimentar (WEI & CHIOU, 2002; HENNEKINNE *et al.*, 2003; KEROUANTON *et al.*, 2007; OSTYN *et al.*, 2010). Vários métodos de genotipagem têm sido utilizados na caracterização de MRSA e MSSA em alimentos (DE BOER *et al.*, 2009; PU *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2010; BHARGANA *et al.*, 2011; FESSLER *et al.*, 2011; SAKWISKA *et al.*, 2011; HAMMAD *et al.*, 2012; ARGUDÍN *et al.*, 2012; VESTEGAARD *et al.*, 2012; WENDLANDT *et al.*, 2013b; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2014; LUINI *et al.*, 2015; BEN SAID *et al.*, 2016; MÜLLER *et al.*, 2016; GONZALEZ *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 2017).

Os métodos de tipagem molecular mais utilizados são baseados na utilização de enzimas de restrição, de forma a clivar o DNA em fragmentos, e analisar o polimorfismo dos mesmos. Dentre as técnicas utilizadas, a macro-restrição ou *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) tem sido bastante empregada. Esta técnica baseia-se na análise de fragmentos de DNA total obtidos pela clivagem por uma enzima de restrição, geralmente *SmaI*, e separação dos fragmentos através da eletroforese em campo pulsado. Os perfis gerados são comparados de acordo com a quantidade e tamanho de bandas obtidas e pela similaridade dos perfis gerados. Considerada como "padrão ouro" para MRSA, a técnica apresenta bom poder discriminatório entre as cepas, porém não permite a comparação interlaboratorial dos resultados. Por este motivo, abordagens baseadas na sequência de DNA estão se tornando mais frequentes, pois as sequências podem ser facilmente comparadas entre laboratórios de diversos países (MCDUGAL *et al.*, 2003; AGIUS *et al.*, 2007).

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método altamente discriminatório para tipificação de cepas e caracteriza isolados com base na sequência de fragmentos internos de aproximadamente 450 pb de sete genes constitucionais (*housekeeping*): *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*. Cada alelo recebe um número, onde através da combinação de alelos dos sete genes *housekeeping* é possível classificar cada isolado como um tipo de sequência (ST) que define a origem evolutiva dos isolados. Aqueles que compartilham mais de cinco alelos idênticos são agrupados em um mesmo complexo clonal, através da comparação com os alelos conhecidos em cada *locus* no banco de dados do MLST (<http://saureus.mlst.net>), sendo possível trabalhar com a epidemiologia local e global, a curto e a longo prazo (PEREZ-LOZADA *et al.*, 2011; MEDIAVILLA *et al.*, 2012). Esta técnica tem sido amplamente utilizada nos estudos envolvendo *S. aureus* (RICHTER *et al.*, 2012; SCAZZOCCHIO *et al.*, 2012; STEFANI *et al.*, 2012).

Uma técnica mais simples, também utilizada para tipificação de *S. aureus*, é o *spa typing*, um método de sequenciamento de um único *locus* que determina as variações na sequência da região polimórfica X ou sequência de repetições curtas (SSR) do gene da proteína A. Essa proteína de superfície é considerada um potente fator de virulência. A diversidade do gene *spa* consiste no número de pequenas sequências de repetições (*repeats*) contidas na região X, onde a diversidade da região SSR parece surgir da deleção e duplicação de unidades repetitivas e, também, por pontos de mutação. Um código alfa numérico é atribuído a diferentes repetições, definindo a

ordem de repetições específicas como tipos de *spa*. Este *locus* é altamente polimórfico, devido a uma região interna de repetições curtas variáveis em *tandem*, que variam não só em número, mas também devido a substituições de nucleotídeos dentro das unidades de repetição individuais (HARMSSEN *et al.*, 2003; AGIUS *et al.*, 2007; MEDIAVILLA *et al.*, 2012). A técnica tem demonstrado a sua utilidade para fins epidemiológicos como a investigação de surtos em vários níveis geográficos com vantagens em termos de rapidez, facilidade de uso, padronização e reprodutibilidade quando comparada com a técnica de MLST (MELLMANN *et al.*, 2006).

A associação entre as diferentes técnicas de genotipagem garante melhor discriminação dos isolados, incluindo os métodos fenotípicos, como perfil de resistência e outros, assim como, permite melhor elucidação da origem da cepa (HENNEKINNE *et al.*, 2012; STROMMENGER *et al.*, 2006; TENOVER *et al.*, 1994).

No Japão, Sato *et al.* (2017) ao investigarem a relação clonal entre 115 cepas MRSA isoladas a partir de humanos (46 HA-MRSA e 54 CA-MRSA), carne no varejo (8 LA-MRSA) e do leite de animais com mastite (7 LA-MRSA) observaram que a maioria das cepas pertenciam ao mesmo complexo clonal CC8 (n = 41) e *spa type* 1767 (n = 16). Os resultados encontrados sugerem que existe ciclo de contaminação entre CA-MRSA, carne e leite. Na Dinamarca, Hasman *et al.* (2010) ao analisarem 112 MSSA isolados de bovinos detectaram por MLST que, os mesmos pertenciam a 3 linhagens diferentes: CC50 (31%; CC97 (28%); e CC151 (16%) sendo mais frequente entre os isolados bovinos os *spa type* t1449 e t1430. Na Tunísia, Ben Said *et al.* (2016) observaram 17 *spa type* diferentes a partir de 43 *S. aureus* isolados de fazendas leiteiras, sendo t2421 (10), t521 (6) e t2112 os mais comumente encontrados. Adicionalmente, 22 cepas de *S. aureus* foram caracterizadas pela técnica de MLST sendo observados oito ST diferentes, agrupados em sete complexos clonais, sendo CC97 o mais comum observado em 45% (10/22) das cepas. Sakwiska *et al.* (2011) observaram relações clonais entre 323 cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino na Suíça (193/323) e França (150/343) nas quais, se identificou 49 diferentes *spa type* sendo que, 14,3% (7/49) dos *spa type* foram encontrados em ambos os países sendo os mesmos, pela técnica de AFLP agrupados em quatro clusters (C8, C20, C97, C151). A partir do emprego das duas ferramentas de genotipagem foi possível observar além da diversidade entre as cepas que, 71% (137/193) dos isolados suíços apresentavam clones em isolados franceses e, da mesma maneira 75% (113/150) dos isolados franceses tinham clones em *S. aureus* suíços. Na Etiópia, Tarekgne *et al.* (2016) analisaram 160

cepas de *S. aureus* isoladas do leite e produtos lácteos nos quais, observaram 25 *spa type* diferentes, sendo os mais comuns t314 (17), t458 (15) e t6218(8). Na Colômbia, Herreira; García-López; Santos (2016) ao investigarem 8 cepas MRSA isoladas de queijos, observaram que todos pertenciam ao ST8 e *spa type* 024. Gonzalez *et al.* (2017) ao investigarem o perfil clonal entre 7 MRSA isolados em queijos minas frescal, no Brasil, observaram que os isolados apresentavam três diferentes perfis no PFGE e, de acordo com MLST apresentaram 4 tipos de sequências (ST1, ST5, ST72 e ST4304). Quatro MRSA foram agrupados em três *spa type* diferentes (t127, t568 e t2703) e, os demais (3 MRSA) as sequências de repetições encontradas não estavam cadastradas no banco *spa type*.

Para o cálculo do tamanho da amostra foi escolhida *L. monocytogenes*, por ser o patógeno previsto de ser investigado na RDC12/2001, mais relevante em termos de consequência para o acometido e cujos casos estão frequentemente associados aos produtos lácteos (FORSYTHE, 2013; MIC OAGAIN & O'BYRNE, 2016). A amostra foi calculada para obter uma probabilidade de 99% de isolamento de *L. monocytogenes* em pelo menos um queijo (i. e ao menos uma mostra positiva), assumindo que o número de bactérias tenha distribuição de Poisson (HOELZER; POUILLOT, 2013). Os parâmetros utilizados para o cálculo foram: 0,001 UFC.g⁻¹(λ); 25 gramas da matriz; sensibilidade do teste microbiológico de 90%. Para cumprir os parâmetros estabelecidos, determinou-se que seria necessário coletar amostra de 205 queijos “tipo colonial” (EPI-Info, 2014).

Para garantir a representatividade, o número de amostras foi dividido entre os 15 pontos de comercialização: oito grupos de Feira Modelo (F) e sete bancas do Mercado Público (M) (Figura 3 e Tabela 4). Cada banca foi visitada no mínimo três e no máximo cinco vezes, com intervalo mínimo de duas semanas, no período de outubro de 2014 a março de 2015. A cada ciclo de amostragem, foi adquirida de forma intencional uma porção de no mínimo 300 gramas de cada uma das marcas de queijo “tipo colonial”, disponíveis para venda em cada ponto de coleta. No momento da coleta foi observado se os produtos estavam refrigerados e se havia identificação no rótulo. Foram considerados refrigerados os produtos conservados em equipamento com capacidade de resfriamento, não sendo aferida a temperatura do mesmo no momento da aquisição. As frações adquiridas foram mantidas em caixas isotérmicas e imediatamente transportadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para realização das análises microbiológicas.

Tabela 4 – Distribuição das amostras coletadas em 15 bancas que comercializavam queijo colonial em Feiras Modelo e no Mercado Público de Porto Alegre, no período de novembro de 2014 a maio de 2015.

Banca	Marcas comercializadas (N)	Marcas								Total de amostras por local
		S ^I 1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	
F ^{II} 1	4	2		4		3	3			12
F2	7	2		4		4	2		6	18
F3	4	2		2		2				6
F4	4		4	4		4				12
F5	4		2	2		4		6	3	17
F6	8		7	6		9		7	6	35
F7	4		2		2	2				6
F8	4		4		4	4		3		15
M ^{III} 1	3	3	2		1	1		2		9
M2	4	4	2		2		2	3		13
M3	3	3	3		2		2	2		12
M4	4	3		1	1		2	2		9
M5	7	5		3	5		2		3	18
M6	2	2		2	2		1		2	9
M7	3	2		6	3		3			14
Total de amostras na semana		28	26	34	22	33	17	25	20	205

(I) semana. (II) Grupo de Feiras Modelo. (III) banca do Mercado Público.

As amostras de queijo colonial colhidas foram avaliadas frente aos parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente para este tipo de queijo, RDC nº12, que preconiza: a investigação da presença de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* e a quantificação de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva e coliformes termotolerantes. Adicionalmente às análises microbiológicas preconizadas na legislação para este alimento foi realizada a análise quantitativa de *Listeria* spp. nas amostras de queijo em que este microrganismo foi detectado.

Na segunda etapa do estudo, as bactérias causadoras de DTA foram caracterizadas quanto a fatores de patogenicidade, resistência e tipificação genotípica. As cepas de *Listeria monocytogenes* foram caracterizadas quanto ao sorotipo. Os isolados de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva foram confirmadas como *S. aureus* a partir da detecção do gene *nuc*. Posteriormente, foi selecionada uma cepa de *S. aureus* de cada amostra de queijo para ser avaliado o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, a capacidade de produção de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), a detecção dos genes de resistência *mecA* e *blaZ*, a detecção do gene *luKS-F* da toxina PVL e a caracterização molecular pela técnica de *spa typing*. De acordo com *spa*

typing apresentado foram selecionados quatro isolados de *S. aureus* para sequenciamento do genoma total e caracterização molecular, pela técnica de MLST *in silico*.

3.2 Análises microbiológicas

As unidades analíticas (25g de queijo) foram coletadas a partir da unidade amostral em capela de fluxo laminar vertical, com o auxílio de facas, pinças e/ou colheres estéreis. Após a remoção da camada externa de um dos lados do queijo, foram colhidas porções de diferentes pontos da matriz, transferindo-as diretamente para embalagens plásticas estéreis até que se completassem 25g necessárias aos procedimentos analíticos. Entre cada amostra processada, era realizada a higienização da capela e da balança com etanol 70° GL, bem como a troca de facas, pinças e colheres estéreis.

3.2.1 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A detecção de *Salmonella* sp. foi realizada de acordo com metodologia descrita no documento ISO 6785:2001(E) compreendendo as etapas de pré-enriquecimento, onde alíquotas de 25 g de queijo foram adicionadas à 225 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) preaquecida a 45° C e incubadas a 37° C durante 16-20 horas; enriquecimento seletivo no qual alíquotas de 0,1 mL do pré-enriquecimento foram inoculadas em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) incubados em banho-maria a 41,5° C por 18-24 horas. Paralelamente, alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento foram inoculadas em 10 mL de caldo Selenito Cistina incubados a 37° C durante 18-24 horas. Após incubação, realizou-se o isolamento em meios sólidos seletivos nos quais 10 µL de cada um dos caldos de enriquecimento seletivo foram inoculados em ágar Verde brilhante-lactose-sacarose (BPLS) e ágar XLD, ambos incubados a 37° C durante 24-48 horas. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram semeadas em ágar nutriente incubados a 37° C durante 18-24 horas. Na confirmação fenotípica foram utilizados os seguintes testes bioquímicos: ureia, indol, tríplice açúcar e ferro, lisina descarboxilase, β-galactosidase, Voges-Proskauer. Como controle dos testes foi utilizado à cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

3.2.2 Detecção de *Listeria monocytogenes*

A análise qualitativa de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com o protocolo descrito no documento ISO 11290-1:1996 emenda 1:2004 compreendendo as seguintes etapas: enriquecimento primário, etapa na qual 25g da amostra foi adicionada a 225 mL de caldo Half-Fraser, homogeneizada e incubada a 30°C durante 24 horas; enriquecimento secundário, onde alíquotas de 0,1 mL da amostra enriquecida foi inoculada em 10 mL de caldo Fraser incubados a 37°C durante 48 horas. Posteriormente, procedeu-se à semeadura em meio seletivo diferencial: nesta etapa alíquotas de 10µL do caldo Half-Fraser e do caldo Fraser foram inoculados separadamente em ágar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA) e em ágar PALCAM, incubados a 37° C durante 24-48 horas. Colônias típicas de *Listeria* em cada um dos meios sólidos foram semeadas em ágar triptose de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) incubado a 37° C por 18-24 horas e, a confirmação fenotípica das colônias se deu a partir dos testes da catalase, coloração de Gram, motilidade, verificação de β-hemólise, fermentação da xilose e ramanose e teste de CAMP. Como controles dos testes foram utilizados as cepas padrão *L. monocytogenes* ATCC 19112 , *L. innocua* ATCC 33090 e *L. ivanovii* ATCC 19119 .

As cepas confirmadas como *L. monocytogenes* foram enviadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz para confirmação e sorotipificação.

3.2.3 Quantificação de *Listeria* sp.

As amostras de queijo em que houve detecção da presença de *Listeria* sp. durante a análise qualitativa foram submetidas à enumeração de acordo com a metodologia da *American Public Health Association* (APHA) de análise dos tubos múltiplos, descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food* (KORNACKI & JOHNSON, 2001). Para tanto, alíquotas de 25g de queijo foram adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1% (AP) e a partir dessa primeira diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . Posteriormente, 1,0 mL de cada diluição foi inoculado em séries de 3 tubos (triplicata) contendo 10 mL de caldo Half-Fraser (enriquecimento primário), homogeneizado e incubado a 30°C durante 24 horas; após o período de incubação, alíquotas de 0,1 mL, de tubo de cada diluição decimal seriada, do enriquecimento primário foram inoculados em tubos de 10 mL de

caldo Fraser (enriquecimento secundário) incubados a 37°C durante 48 horas. Posteriormente, alíquotas de 10 µL do caldo Fraser, de cada tubo de cada diluição, foram semeadas separadamente em placas de ágar ALOA e PALCAM, incubados a 37° C durante 24-48 horas. As colônias típicas de *Listeria* spp. foram semeadas em ágar TSA-YE incubado a 37° C por 18-24 horas e a confirmação fenotípica das colônias se deu a partir dos testes da catalase, coloração de Gram, motilidade, verificação de β-hemólise, fermentação da xilose e ramanose e CAMP. O cálculo do número de *Listeria* spp. na amostra (NMP.g⁻¹) foi feita a partir do número de tubos de cada diluição em que houve detecção de *Listeria* spp. com o auxílio de Tabela de cálculo de Número mais Provável (NMP) (NEUSELY *et al.*, 2010).

3.2.4 Enumeração Coliformes termotolerantes

A enumeração de coliformes termotolerantes foi conduzida de acordo com a metodologia da *American Public Health Association* (APHA) de análise de tubos múltiplos, descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food* (KORNACKI & JOHNSON, 2001). Alíquotas de 25g de queijo foram adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1% (AP) a partir dessa primeira diluição (10⁻¹) foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻³. Posteriormente, 1,0 mL de cada diluição foi inoculado em séries de 3 tubos (triplicata) de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) incubados à 37°C por 24-48 horas. As amostras que apresentaram turbidez e produção de gás no caldo LST foram inoculadas, primeiramente em caldo Verde Brilhante a 2% (VB) por um período de 24-48 horas a 37° C. Posteriormente, alíquotas de 10 µl dos tubos de caldo VB que apresentaram turbidez e produção de gás indicando a presença de coliformes totais foram inoculadas em caldo *Escherichia coli* (EC) incubados a 44,5-45,5° C durante 24 horas. Os resultados para coliformes termotolerantes foram detectados a partir do número de tubos que apresentaram, concomitantemente, turbidez e produção de gás no caldo EC indicando a presença de coliformes termotolerantes, com auxílio de tabela para cálculo de NMP (REF). Como controles dos testes foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

3.2.5 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva

A pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada com base no documento ISO 6888-1:1999. Alíquotas de 25g de queijo foram adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1% (AP). A partir dessa diluição (10^{-1}), foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . Posteriormente, 1,0 mL de cada diluição foi semeado, pela técnica de plaqueamento em superfície, em três placas de Petri (90mm) de ágar Baird-Parker (BP) incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Após este período foi realizada as contagens das Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC.g⁻¹) de amostra em placas contendo no máximo 300 colônias (150 colônias típicas e/ou atípicas em duas diluições sucessivas). Foram selecionadas cinco colônias típicas e cinco atípicas em ágar BP, inoculadas em caldo BHI (*Brain-heart infusion broth*) incubados a 37°C durante 24 horas para confirmação fenotípica a partir das provas bioquímicas de coloração de Gram, catalase e coagulase. Como controles dos testes foram utilizados as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

3.3 Identificação genotípica da espécie *Staphylococcus aureus*

Um isolado de *Staphylococcus* coagulase positiva de cada amostra de queijo foi selecionado para confirmação da espécie *S. aureus* a partir da amplificação do gene *nuc* que codifica a Nuclease Termoestável (termonuclease ou TNase).

3.3.1 Extração de DNA

O DNA total foi extraído através do kit PureLink[®] Genomic DNA (Invitrogen[®]). A partir de culturas de 18-24 horas de crescimento em Agar TSA (Oxoid) a 35°C±1 foram preparadas suspensões bacterianas em 162µL de tampão de pré-lise contendo 25mM Tris-HCl (pH 8,0); 2,5mM EDTA; 1% Triton X-100; lisozima (20mg/mL), suplementado com 18µL de lisostafina (Sigma-Aldrich[®]) (1 mg/mL). Após incubação em banho-maria (37°C, por 18 horas) foram acrescidos 200µL de tampão de lise celular acrescidos com 20 µL de proteinase K e incubados a 55°C por 30 min. A sequência da extração do DNA total de cada um dos isolados foi realizada conforme instruções do fabricante. Após a extração, foi verificada a concentração do DNA através do quantificador Quantus[™] Fluorometer (Promega[®]) e armazenadas a -20°C.

3.3.2 Amplificação do gene da termonuclease estável (*nuc*)

Foi aplicado o protocolo descrito por Brakstad *et al.* (1992) para amplificação do gene *nuc*. Os oligonucleotídeos utilizados foram: 5' GCGATTGATGGTGATACGGTT3' (primer 1, *forward*) e 5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC3' (primer 2, *reverse*), gerando um produto de 269 pares de base (pb). Foram utilizados como controle positivo e negativo da reação as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

Cada reação de PCR foi realizada para um volume final de 50 µL, sendo deste volume 32,1µL de água ultrapura, 2,0µL de cada primer (20pmol/µL), 5 µL de tampão 10X PCR Rxn Buffer (Invitrogen®), 2,5 µL MgCl₂ (50mM), 4 µL dNTP's mix (2,5 mM), 0,4 µL Taq Polimerase 5 U/µL (Invitrogen®) e 2 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 5 min a 94°C; seguido de 37 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 55°C e 90s a 72°C; e 3,5 min a 72°C. O amplicon foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, adicionado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia). As amostras foram visualizadas em transiluminador (Kasvi®) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 1 kb GelPilot (Qiagen).

3.4 Determinação da CIM de antimicrobianos

Uma cepa de *S. aureus* provenientes de cada queijo positivo foi avaliada quanto ao perfil de resistência antimicrobiana a partir da determinação da CIM pelo Método de Microdiluição em Caldo, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016), em placas de poliestireno contendo 96 poços de fundo chato (SPL Life Science, Coréia). Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: cefoxetina (Sigma-Aldrich, EUA), ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, EUA), eritromicina (Sigma-Aldrich, EUA), gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA), oxacilina (Sigma-Aldrich, EUA), penicilina (Sigma-Aldrich, EUA), tetraciclina (Sigma-Aldrich, EUA) e vancomicina (Sigma-Aldrich, EUA).

A escolha dos antimicrobianos, intervalo das concentrações dos antimicrobianos e valores de *breakpoints* utilizados na interpretação dos resultados foram realizados de acordo com as recomendações do CLSI – M100S (2016) e EUCAST (EFSA, 2012)

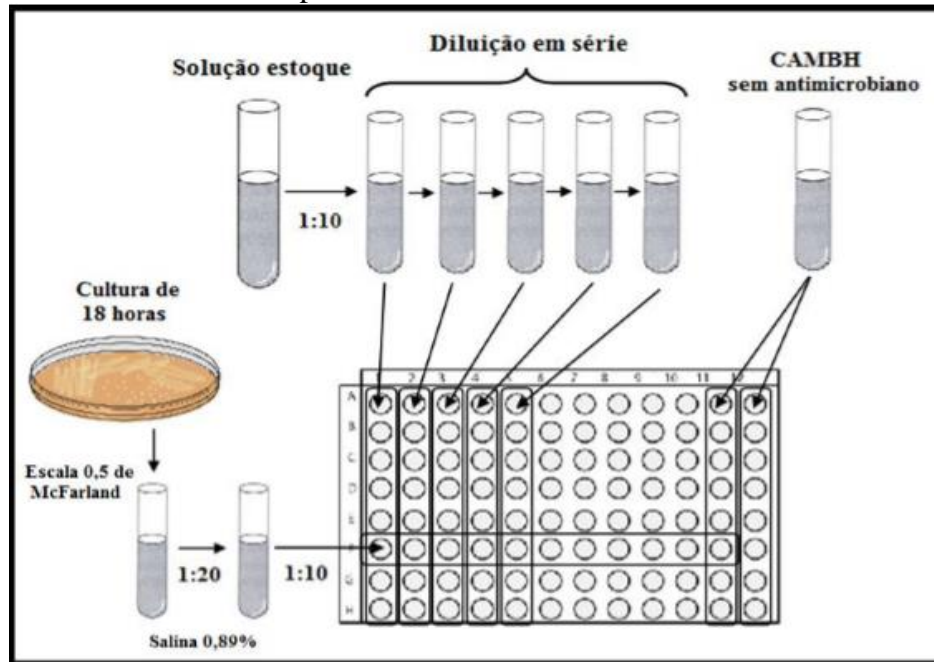
(Tabela 5). Como controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Para preparação das soluções estoque, foram adotados os solventes e diluentes recomendados pelo CLSI (2013), ou conforme instruções dos fabricantes. As concentrações das soluções estoque foram equivalentes a dez vezes a concentração mais alta a ser testada e de pelo menos 1.000 mg.L⁻¹.

Tabela 5 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações e valores de *breakpoint*.

Antimicrobiano	Concentrações (mg/L)	ECOFF (mg/L)	<i>Breakpoint</i> (µg/mL)
Cefoxetina	0,12-64	> 4	≥ 8
Ciprofloxacina	0,03-32	> 1	≥ 4
Eritromicina	0,03-256	> 1	≥ 8
Gentamicina	0,03-32	> 2	≥ 16
Oxacilina	0,03-32	ND	≥ 4
Penicilina	0,03-256	ND	≥ 0,25
Tetraciclina	0,03-256	>1	≥ 16
Vancomicina	0,03-32	> 2	≥ 16

Após completa homogeneização, as soluções estoque foram fracionadas em volumes de 1 a 5 mL, acondicionadas em tubos de ensaio e armazenadas a -20°C até a utilização. As concentrações finais dos antimicrobianos foram obtidas através de diluições seriadas das soluções estoque, em caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CAMBH) (Fluka, EUA). O caldo CAMBH, já acrescido de antimicrobiano, foi distribuído em ordem crescente de concentração nos poços, com um volume final de 90 µL. Somente para oxacilina foi utilizado CAMBH com 2% de cloreto de sódio. Após, adicionou-se os isolados a serem testados em uma concentração de 5 x 10⁴ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por poço. Para obtenção da concentração final de cada isolado, foram utilizadas culturas de 18 horas e, a partir destas, os isolados foram ajustados até turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland – correspondente a 1 x 10⁸ UFC. Após, foi realizada diluição 1:20 para atingir uma concentração de 5 x 10⁶ UFC e, desta, foram transferidos 10 µL para os poços contendo 90 µL de caldo CAMBH já acrescido de antimicrobiano, resultando em concentração final de 5 x 10⁵ UFC por mililitro, ou ainda, 5 x 10⁴ UFC por poço (Figura 4).

Figura 4 – Esquema dos procedimentos adotados para determinação da CIM de antimicrobianos para isolados de *S. aureus*.



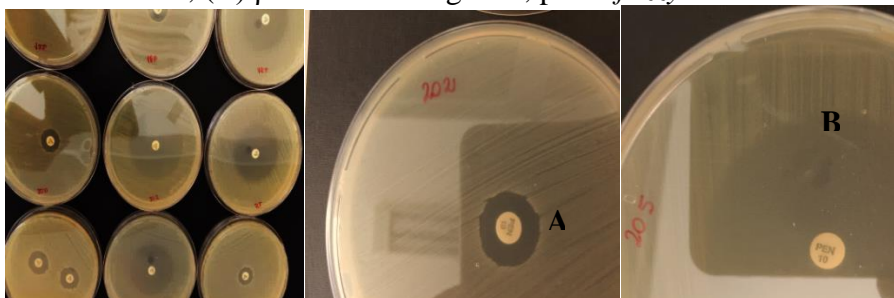
Após, as placas foram seladas com parafilme e incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas. Sendo que, para oxacilina, vancomicina e cefoxetina o período de incubação foi de 24 horas. As placas foram examinadas sob um fundo escuro e a menor concentração de um dado antimicrobiano na qual não pode ser observado crescimento bacteriano foi considerada a CIM do antimicrobiano para o isolado testado. O isolado em teste foi inoculado em CAMBH sem antimicrobiano, para certificar a capacidade de crescimento bacteriano (controle positivo). Como controle negativo, poços da placa de teste foram preenchidos com $100\ \mu\text{L}$ de CAMBH sem antimicrobiano e sem inóculo. Em cada placa, as cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram inoculadas como controle de qualidade do teste.

Para controle de qualidade do teste, periodicamente, a contagem em placa das suspensões das cepas *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram realizadas. Para tanto, $10\ \mu\text{L}$ do poço controle positivo foram inoculados em 10 mL de salina e, desta, $100\ \mu\text{L}$ foram espalhados pela técnica de *spread plate* em TSA e incubados a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. A contagem de 20 a 80 colônias, correspondendo a 2 a 8×10^5 UFC por mililitro, garantia que a correta diluição dos microrganismos estava sendo realizada.

3.5 Teste de detecção da produção de β -lactamase em *Staphylococcus*

O teste de detecção da produção de β -lactamase foi realizado pelo método de disco difusão em ágar, utilizando discos de penicilina (10 μ g), de acordo com recomendação do documento M100S do CLSI (2016). Colônias de cada isolado com 24 horas de cultivo em TSA (Oxoid) foram transferidas para solução salina 0,85% até uma concentração de 0,5 na escala *McFarland* e semeadas na superfície de ágar Muller-Hinton (Oxoid). A seguir, discos de penicilina 10 μ g (Oxoid) foram depositados na superfície do ágar e as placas incubadas a 35 \pm 2°C por 16-18 horas. Na interpretação do resultado foi observada a borda do halo de inibição de cada isolado de *S. aureus*, sendo considerados β -lactamase positivos aqueles que apresentaram uma borda regular “*sharp zone edge*” enquanto que, os que apresentaram bordas irregulares “*fuzzy zone edge*” foram classificados como não produtores de β -lactamase (Figura 5). Foram utilizadas como controle negativo e positivo do teste as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213, respectivamente.

Figura 5 – Teste de detecção da produção de β -lactamase (A) produção positiva de β -lactamase, (B) β -lactamase negativa, perfil *fuzzy* de bordos de inibição.



3.6 Detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos

3.6.1 Pesquisa do gene *blaZ*

A amplificação do fragmento de 377 pb do gene *blaZ* foi realizada de acordo com protocolo descrito por Olsen *et al.* (2006) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG-3') e (5'-TAAGAGATTTGCCTATGCTT-3'). A reação era constituída de 18,8 μ L de água ultrapura, 2,5 μ L de Tampão 10X contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM KCl (Ludwig-Biotec), 1 μ L MgCl₂ 50mM, 0,5 μ L dNTP mix 10mM, 0,5 μ L de cada primer

(10pmol/ μ L), 0,2 μ L Taq Polimerase (Ludwig-Biotec) e 1 μ L de DNA em uma reação final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 94°C por 3min seguido de 30 ciclos (60s a 94°C, 60s a 54°C, 60s a 72°C) e extensão final 72°C por 10min. Foram utilizadas como controle negativo e positivo das reações as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213, respectivamente. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, adicionados de Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e visualizados em transiluminador (Kasvi) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 1kb Plus DNA (Invitrogen®).

3.6.2 Resistência à metilina

A amplificação do fragmento de 532 pb do gene *mecA* foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3') e (5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'), descritos por Murakami *et al.* (1991). A reação final com volume de 25 μ L foi constituída de 17,8 μ L de água ultra pura; 2,5 μ L de tampão 10X contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM KCl (Ludwig-Biotec); 0,5 μ L MgCl₂ (50mM), 2,0 μ L dNTP's mix (10mM), 0,5 μ L de cada primer (20pmol/ μ L), 0,2 μ L Taq Polimerase (Ludwig Biotec) e 1 μ L de DNA. Como controle positivo da reação foi utilizado a cepa de referência *S. aureus* ATCC 43300. Como controles negativos foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e água ultrapura estéril. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 94°C por 3min; 35 ciclos de 60s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C; e 4min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, adicionados de Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e visualizados em transiluminador (Kasvi) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 1kb Plus DNA (Invitrogen®).

3.7 PCR para detecção do gene *lukS-F*

O gene *lukS-F* codifica o fator de virulência denominado Leucocidina de Panton-Valentine (PVL). A amplificação do fragmento de 433 pb foi realizada

utilizando as seguintes sequências de oligonucleotídeos iniciadores: luk-PV1: 5' - ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA - 3'; luK-PV2: 5' - GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC - 3' descritas por Lina *et al.* (1999). A mistura da reação foi preparada com volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl²); 80 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada oligonucleotídeo; 1 U de taq DNA polimerase; 20 ng do DNA template a amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 94°C por 5min; 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C e 60s a 72°C; e 7min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, adicionados de Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e visualizados em transiluminador (Kasvi) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 1kb Plus DNA (Invitrogen®). Como controle positivo da reação foi utilizado à cepa *S. aureus* ATCC 49775 e, como controles negativos *S. aureus* ATCC 25923 e água ultrapura estéril.

3.8 Tipificação molecular dos isolados de *S. aureus* pela técnica de *spa typing*

3.8.1 Amplificação da região repetida da proteína A do *S. aureus*

A amplificação da região repetida da proteína A foi realizada de acordo com protocolo descrito por Shopsin *et al.* (1999) utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: spa-1113f (5'TTAAGACGATCCTTCGGTGAGC3') e spa-1514r (5'GACCAGTAGTGCCGTTTGCTT3') gerando um produto com 442 pb. A reação final com volume de 75µL foi constituída de 52,65µL de água ultra pura, 7,5µL de tampão 10X contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM KCl (Ludwig-Biotec), 2,25µL MgCl₂ (50mM), 6,0µL dNTP's mix (10mM), 1,5µL de cada primer (10pmol/µL), 0,6µL Taq Polimerase (Ludwig Biotec) e 3µL de DNA. Como controle positivo da reação foi utilizado a cepa de referência *S. aureus* ATCC 25923. Como controles negativos foram utilizados *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e água ultrapura estéril. a amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 80°C por 5min; 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 60°C e 90s a 72°C; e 10 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, adicionados de

Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e visualizados em transiluminador (Kasvi) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 1kb Plus DNA (Invitrogen®).

3.8.2 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento do DNA

O produto obtido da reação de PCR foi purificado pelo kit Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), conforme orientações do fabricante e quantificado por fluorescência em quantificador Quantus™ Fluorometer (Promega®) para padronização dos produtos entre 3 a 10 ng.

O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos purificados da reação de PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol do primer *spa*-1113f (5'TTAAGACGATCCTTCGGTGAGC3') e *spa*-1514r (5'GACCAGTAGTGCCGTTTGCTT3') em alíquotas distintas, e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15s, 50°C por 15s e 60°C por 4 min. Depois de marcadas as amostras foram purificadas por precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

3.8.3 Análise das sequências

A análise das sequências foram realizadas com auxílio do *software* disponível em <http://spatyper.fortinbras.us/> sendo os resultados posteriormente comparados com a base de dados disponível em Ridom SpaServer em <http://www.spaserver.ridom.de/>.

3.9 Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas

A pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SE) foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão.

A amplificação dos fragmentos dos genes codificadores das enterotoxinas A, B, C, D e E foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 6. As reações em volume final de 25µL continham: 8,5µL de água ultrapura, 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1µL de cada primer (10pmol/µL, exceto para enterotoxina C cuja concentração era 50pmol/µL) e 2µL de DNA (50ng/µL). A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-100® (BIO-RAD). As condições de amplificação, bem como, as cepas de referência utilizadas como controles positivos estão descritas na Tabela 7. Para todas as reações, água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo. Os produtos de amplificação das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, adicionados de GelRed™ (Biotium), e visualizados em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus®), sendo comparados com o marcador de massa molecular 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen®).

Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações para a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SE).

Gene alvo	Sequência 5'- 3'	Fragmento esperado (pb)	Referência
<i>seaf</i>	ACGATCAATTTTACAGC	544	Rosec; Gigaud, 2002
<i>sear</i>	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC		
<i>sebf</i>	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA	404	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>sebr</i>	ATCCCGTTTCATAAGGGCGAGT		
<i>secf</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	Rosec; Gigaud, 2002
<i>secr</i>	AAATCGGATTAACATTATCCA		
<i>sedf</i>	CAAATATATTGATATAATGA	330	Zocche <i>et al.</i> , 2009
<i>sedr</i>	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA		
<i>seef</i>	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>seer</i>	CACCTTACCGCAAAGCTG		

Tabela 7 – Condições das reações de amplificação dos genes de enterotoxinas clássicas de estafilococos e cepas de referência utilizadas para o controle positivo das reações de PCR.

Enterotoxinas	Condições da reação			Cepa referência
A, B e D	95°C	5min	1 ciclo	<i>Staphylococcus aureus</i> FRI ¹ S6 (A e B)
	95°C	1min		
	44,5°C	1min	37 ciclos	
	72°C	1min		
	72°C	10min	1 ciclo	<i>Staphylococcus aureus</i> FRI ¹ 361 (D)
C	95°C	5min	1 ciclo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ² 19095
	95°C	45seg		
	46,2°C	45seg	35 ciclos	
	72°C	45seg		
	72°C	10min	1 ciclo	
E	95°C	5min	1 ciclo	<i>Staphylococcus aureus</i> FRI ¹ 326
	95°C	45seg		
	51°C	45seg	37 ciclos	
	72°C	45seg		
	72°C	10min	1 ciclo	

(1) Food Research Institute, (2) American Type Culture Collection

3.10 Sequenciamento genoma total

Quatro isolados de *Staphylococcus aureus*, epidemiologicamente não relacionados e com a presença de *spa* type e marcas distintas, foram selecionados aleatoriamente para o sequenciamento do genoma total (*Whole genome sequencing* – WGS). Para tanto, o DNA total dos isolados foi extraído com o kit Purelink (Invitrogen), utilizando para eluição EB *buffer* (10 mM Tris-HCl pH 8,5). O mesmo foi quantificado pelo Quantus Promega de modo que, 50 uL do DNA genômico, com 20 ng/uL foram enviados para a empresa *MicrobesNG* (Birmingham, UK) para o sequenciamento total, na qual utilizaram a plataforma MiSeq (Illumina), 2x250 bp *paired-end*. As sequências obtidas foram montadas pelo programa SPAdes, e anotado pelo *software* Prokka.

3.11 Multilocus sequence typing (MLST)

Nos genomas totais obtidos, foram realizados *in silico* a análise de MLST (LARSEN *et al.*, 2012), através do software MLST 1.8 disponível no site do *Center for*

Genomic Epidemiology, Technical University of Denmark (DTU) da Dinamarca (<http://www.genomicepidemiology.org>). A base de dados utilizada pelo software foi obtida pelo PubMLST.org.

3.12 Genes de resistência – ResFinder

Nos mesmos genomas foi realizado a pesquisa de genes de resistência adquiridos através do software ResFinder 3.0 também disponível no site o Center for Genomic Epidemiology, DTU, Dinamarca (ZANKARI *et al.*, 2012).

3.13 Análise de *Listeria monocytogenes* por macrorestrição (PFGE)

A preparação do DNA total, para a realização da eletroforese em campo pulsado (PFGE), foi conduzida como descrita previamente (PULSNET, 2009, com adaptações).

3.13.1 Suspensão Celular

As células de *L. monocytogenes* foram reativadas em caldo BHI/YE e incubadas por 14-18 horas a 37°C. Assim como, o marcador de peso molecular *Salmonella* Braenderup. A partir deste caldo, uma alíquota foi semeada por esgotamento em placas de TSA/YE incubadas 24 horas a 37°C. Após este período, selecionaram-se as colônias, que foram semeadas em tubos contendo 1 mL de tampão TE com sódio até atingir a absorvância de 610 nm. Este valor corresponde a 6,5 na escala de McFarland.

A partir desta suspensão, foram transferidos 400 µL de cada solução de células bacterianas para microtubos com capacidade de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 200 µL de lisozima (20 mg/mL, Sigma) em cada microtubo. Estes foram cuidadosamente homogeneizados e incubados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos.

3.13.2 Blocos de Agarose

Aos microtubos contendo a suspensão celular em lizozima foram adicionados 400 µL de solução SSP constituída de 1% de agarose Pulsed Field (Bio Rad), 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS – Invitrogen) e, 0,5 mg/mL de proteinase K em tampão TE (10 Mm, Tris: 1 mM EDTA, pH 8,0) aquecida a 56°C. Os microtubos foram homogeneizados e, imediatamente, a suspensão foi dispensada dos moldes para blocos. A solidificação foi realizada em temperatura ambiente durante 30 minutos.

3.13.3 Lise celular

O tampão de lise foi preparado utilizando-se 5 mL de solução de lise (1M Tris-HCl; 0,5M EDTA, pH 8,0; 1% de Sarcosina e 0,1 mg/mL de protinase K) para cada amostra. Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 4 mL de tampão de lise. Em seguida, os mesmos foram incubados durante 24 horas em banho-maria a 54°C.

3.13.4 Lavagens

Após a lise, os blocos de agarose foram lavados. Realizaram-se duas lavagens de 15 minutos, com água bidestilada estéril pré-aquecida a 54°C sob agitação constante. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com tampão TE, pH 8,0 (pré-aquecido a 54°C), com duração de 15 minutos cada. Após a ultima lavagem, os blocos de agarose foram armazenados em tubos Falcon contendo 5 mL de tampão TE, mantidos sob refrigeração até a restrição.

3.13.5 Restrição DNA cromossomal

Os blocos de agarose contendo o DNA cromossomal foram cortados em três pedaços de aproximadamente 2 mm cada, as quais foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição. O DNA das cepas de *L. monocytogenes* foram digeridas com a enzima ApaI e a cepa padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup, com a enzima XbaI. A digestão foi realizada pelo período de 2 horas a 25°C para a enzima ApaI, com uma concentração de 50U/µL e, a 37°C para as enzimas XbaI, na concentração de 10 U/µL.

3.13.6 Eletroforese em campo pulsado

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1% agarose Pulsed Field, Biorad) em tampão TBE 0,5X (0,9 M Tris base, 0,9 M ácido bórico, 0,02 M de EDTA), sendo os fragmentos separados no equipamento CHEF DR II (Biorad) em temperatura de 14°C, durante 19 horas (6 V/cm⁻¹). O tempo de pulso inicial de 4 segundos e o tempo final 40 segundos. Após a corrida o gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídeo 50 µL (10 mg/mL) em 500 mL de água destilada por 30 minutos e descorado por 60 minutos, trocando-se a água a cada 20 minutos. A imagem foi capturada com o auxílio de um transiluminador (*Transiluminador High Performance UV Transilluminator, UVP*). As imagens foram salvas como arquivo TIFF e analisadas usando o *software* GelCompar.

3.14 Análise estatística

Os dados foram analisados de forma descritiva para avaliação de frequências de não conformidade e quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo e coliformes termotolerantes.

Hipóteses estatísticas foram testadas para verificar a associação entre a frequência de não conformidade (de acordo com a classificação da RDC nº12 - ANVISA) e os pontos de amostragem no Mercado Público e Feira Modelo. Adicionalmente, foram testados os efeitos dos pontos de amostragem Mercado Público e Feira Modelo sobre a frequência de não conformidade de *Staphylococcus aureus* e de coliformes termotolerantes controlados pela inclusão da variável marcas de queijo. O modelo foi o de Poisson com variância robusta utilizando os pacotes “sandwich” e “epiDisplay” do software R. A estimativa do modelo foi interpretada como Razão de Prevalência (RP) de não conformidade utilizando-se como referência a Feira Modelo.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras de queijo colonial

Do total de 205 amostras de queijo colonial analisadas, 84 (40,9%) foram provenientes do Mercado Público e 121 (59,1%) de Feiras Modelo. No Mercado Público foi coletado um mínimo de nove e máximo de 18 queijos por banca; enquanto que nas Feiras Modelo o número variou de seis a 35 amostras colhidas em cada feira. No momento da aquisição dos queijos, observou-se que a maioria (89,7%) estava armazenada em equipamento de refrigeração (Tabela 8). Nas Feiras Modelo houve uma tendência de maior frequência (14,9%) de exposição de queijos à temperatura ambiente, comparado ao Mercado Público (3,6%).

Tabela 8 – Distribuição dos queijos amostrados em bancas do Mercado Público (M1-M7) e de Feiras Modelo (F1-F8) do município de Porto Alegre, de acordo com a forma de armazenamento durante a comercialização.

Ponto de amostragem	Amostras	Sem de refrigeração	Refrigerado
F1	12	8	4
F2	18		18
F3	6		6
F4	12		12
F5	17	1	16
F6	35		35
F7	6	2	4
F8	15	7	8
Subtotal	121	18 (14,9%)	103 (85,1%)
M1	9		9
M2	13		13
M3	12		12
M4	9	3	6
M5	18		18
M6	9		9
M7	14		14
Subtotal	84	3 (3,6%)	81 (96,4%)
Total Geral	205 (100%)	21 (10,20%)	184 (89,70%)

As 205 amostras de queijo pertenciam a 17 marcas (Tabela 9), as quais foram adquiridas entre uma e 39 vezes, de acordo com a disponibilidade. A marca mais

frequentemente adquirida C e, juntamente com as marcas B, D, F, H e P, foram amostradas pelo menos uma vez em cada coleta.

Considerando a distribuição das marcas nos pontos de venda, a marca F esteve disponível para comercialização em 13 dos 15 pontos de amostragem do estudo. As marcas I, L e P foram adquiridas apenas de bancas no Mercado Público enquanto A, G, H, J, K, M, N e O estiveram disponíveis apenas em bancas das Feiras Modelo.

Tabela 9 – Distribuição das marcas de queijos amostrados em bancas de Feiras Modelo (F1-F8) e do Mercado Público (M1-M7) do município de Porto Alegre de acordo com o ponto de venda.

Marca	Ponto amostrado															Total	
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7		
A		1														1	
B				3		4										5	12
C			1	3		3			2	5	5	5	5	5	5	39	
D					6		3						4			13	
E	3							4								7	
F	2	2	2	3	4	13	1	3	2	1	2	1	1			37	
G					3		1									4	
H	4			3		4		4								15	
I												1	1			2	
J	3	4				1		4								12	
K		2														2	
L									2				2			4	
M		4				5										9	
N		1	2													3	
O		4				3										7	
P									5	5	5	2	4	4	4	29	
Q			1		4	2	1						1			9	
Total	12	18	6	12	17	35	6	15	9	13	12	9	18	9	14	205	

4.2 Qualidade microbiológica dos queijos colonial

As análises microbiológicas evidenciaram que 47,31% (97/205) dos queijos estavam não conformes com pelo menos um dos parâmetros microbiológicos estabelecidos na legislação vigente para este alimento, portanto impróprios ao consumo humano (Tabela 10).

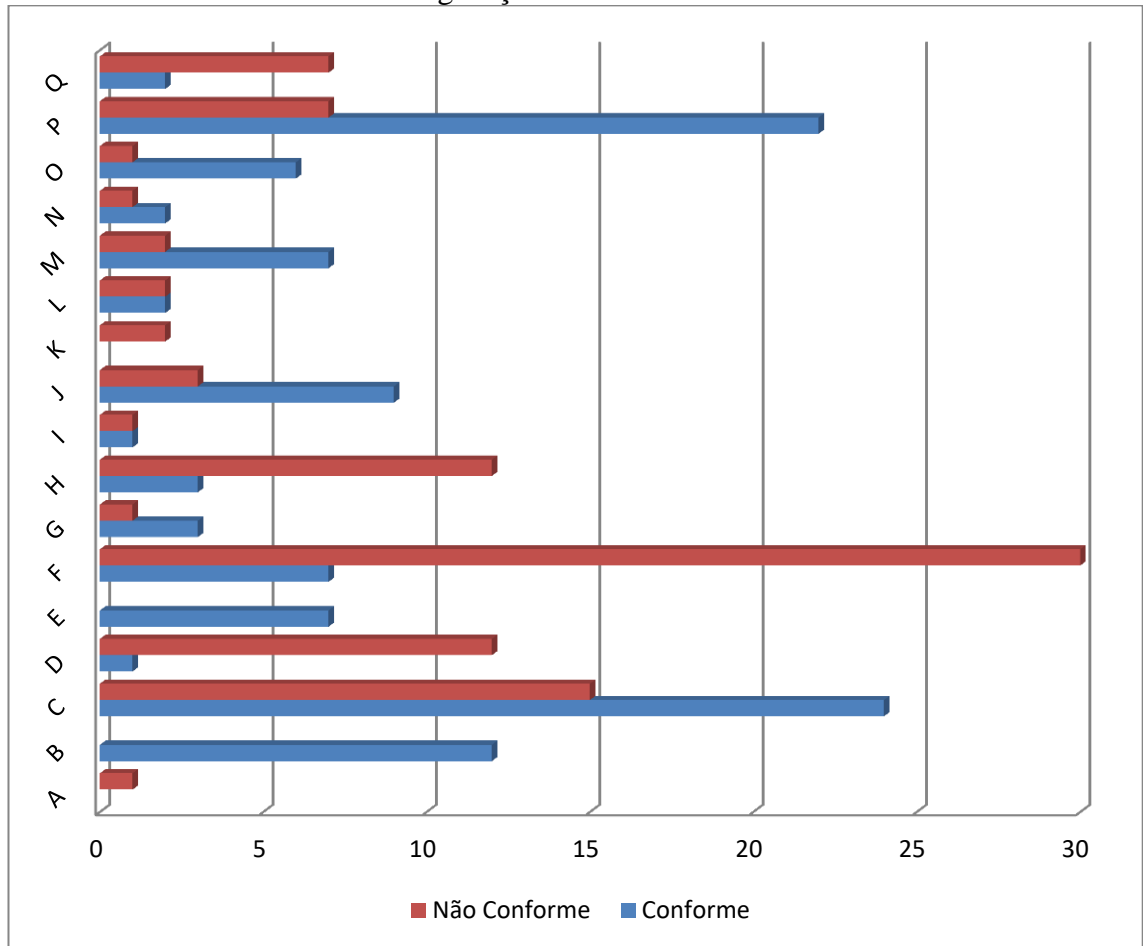
Tabela 10 - Número de amostras de queijo colonial, em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos na RDC nº 12, nos 15 pontos de amostragem no Mercado Público e Feira Modelo do município de Porto Alegre.

Pontos de amostragem	n	Número de amostras em desacordo com os padrões microbiológicos (%)			
		Enumeração		Detecção	
		<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	Coliformes a 45°C	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria monocytogens</i>
F ^I 1	12	4 (33,33%)	0	0	0
F2	18	6 (33,33%)	2 (11,11%)	0	0
F3	6	5 (83,33%)	0	0	0
F4	12	7 (58,33%)	0	0	0
F5	17	12 (70,58%)	1 (5,88%)	0	0
F6	35	13(37,14%)	5 (14,28%)	0	1 (2,85%)
F7	6	5 (83,33%)	2 (33,33%)	0	0
F8	15	7 (46,66%)	2 (13,33%)	0	0
M ^{II} 1	9	4 (44,44%)	3 (33,33%)	0	2 (22,22%)
M2	13	5 (38,46%)	1(7,69%)	0	0
M3	12	4 (33,33%)	2 (16,66%)	0	0
M4	9	2 (22,22%)	0	0	0
M5	18	7 (38,88%)	4 (22,22%)	0	2 (11,11%)
M6	9	2 (22,22%)	0	0	0
M7	14	0	0	0	1 (7,14%)
Total*	205	83 (40,48%)	22 (10,73%)	0	6 (2,92%)

F= Feiras Modelo; M= bancas do Mercado Público

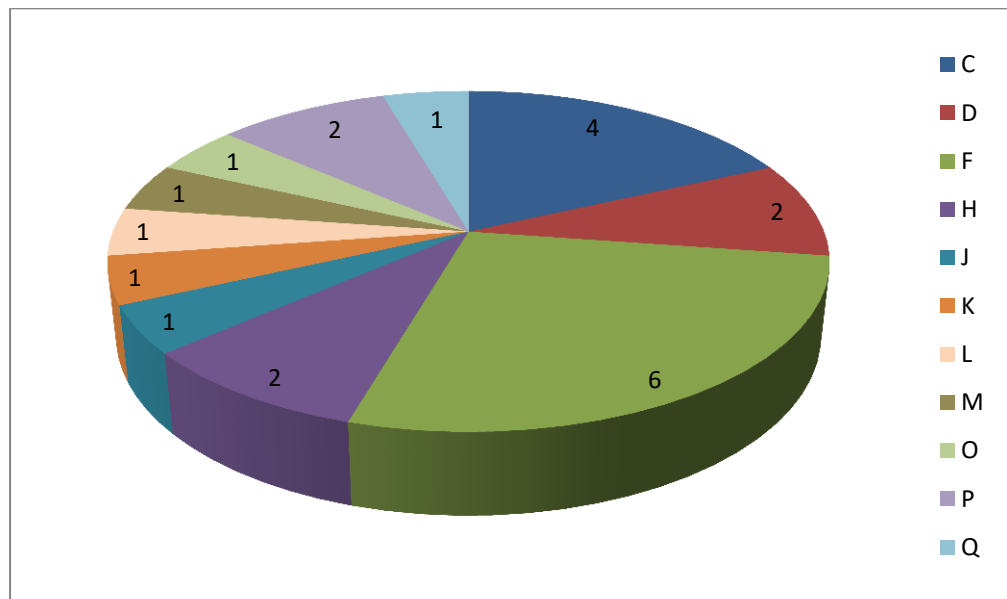
A figura 06 representa a distribuição de conformidades e não conformidades aos parâmetros microbiológicos estabelecidos na legislação entre as marcas de queijos coloniais amostradas.

Figura 06 - Distribuição dos queijos conformes e não conformes aos parâmetros estabelecidos na legislação entre as diferentes marcas amostradas.



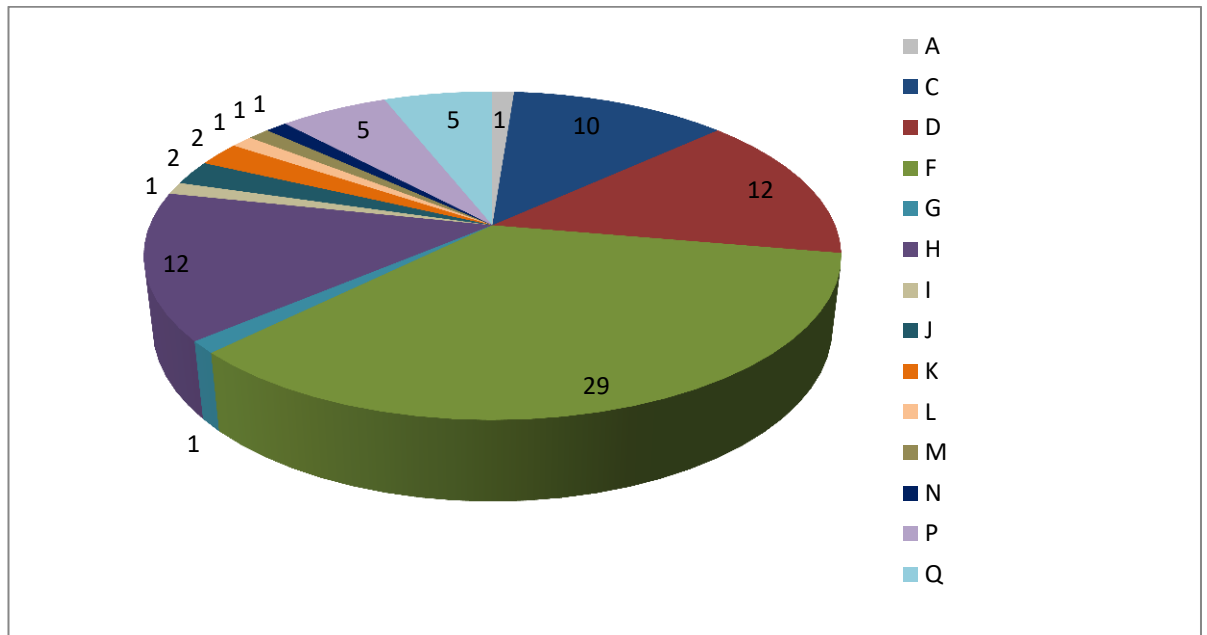
Com relação à quantificação de coliformes termotolerantes, 10,73% (22/205) das amostras apresentaram contagens superiores ao limite máximo estabelecido na legislação de 10^3 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C sendo que, não foram encontradas associações significativas entre o tipo de estabelecimento de comercialização e quantificação de coliformes termotolerantes, tampouco foram encontradas diferenças significativas entre as marcas amostradas (Figura 07).

Figura 07 - Distribuição dos queijos não conformes à legislação para coliformes termotolerantes entre as diferentes marcas amostradas.



A quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva revelou que 40,48% (83/205) das amostras de queijo colonial apresentaram valores superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação ($1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹). As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva variaram entre $<1,0$ UFC.g⁻¹ e $3,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, sendo a mediana $<1,0$ UFC.g⁻¹. Em média, a prevalência de não conformidade (NC) frente a este parâmetro microbiológico quantitativo foi 57% maior nas Feiras Modelo do que no Mercado Público ($p < 0,05$; RP=1,57; IC95%: 1,09 – 2,27). No entanto, ao ajustar a estimativa do efeito do ponto de amostragem (Feira ou Mercado Público) pela inclusão da marca do queijo no modelo, o local de amostragem deixou de ser significativo ($p > 0,05$; RP=1,02; IC95%: 0,71 – 1,48) e, algumas marcas tiveram diferenças significativas ao contrastarem-se umas com as outras, sendo F a marca mais frequente frente a esta não conformidade, conforme figura 8.

Figura 8 - Distribuição de queijos colonial com violação para *Staphylococcus coagulase* positiva entre as marcas amostradas.



Limites acima do aceitável pela legislação foram observados em 5,85% (12/205) dos queijos amostrados tanto para *Staphylococcus coagulase* positiva quanto para coliformes termotolerantes, estando estes distribuídos entre as marcas C (n=1), D (n=2), F (n=5), H (n=2), K (n=1) e P (n=1).

No que diz respeito à pesquisa de *Salmonella* sp., todas as amostras apresentaram-se em conformidade com a legislação vigente, ou seja, houve ausência deste microrganismo em 25 g do produto. Por outro lado, seis amostras de queijo violaram o parâmetro de ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra.

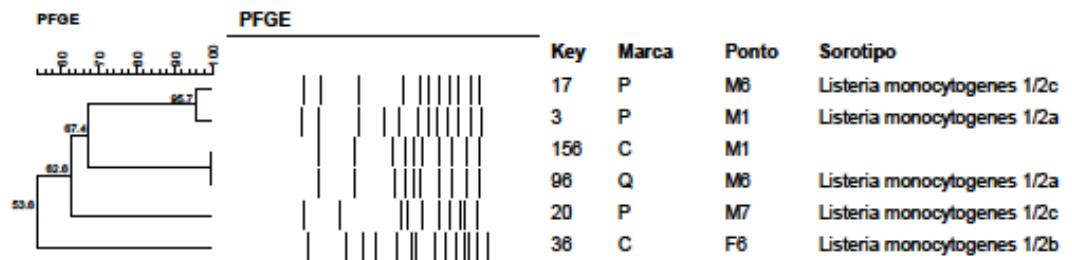
4.3 Caracterização de *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* foi detectado em 12,19% (25/205) dos queijos coloniais amostrados, distribuídos em nove marcas: F (n=8); C (n=5); M e P (n=3); J (n=2); K, Q e O (n=1). 52% (13/25) destes queijos estavam disponíveis para comercialização nas feiras e 48% (12/25) no mercado público (Tabela 11). Em relação à quantificação de *Listeria* sp. nos queijos positivos, duas amostras apresentaram contagens de 3,6 NMP.g⁻¹ e 11 NMP.g⁻¹, nos demais, 23 queijos a população encontrada foi < 3,0 NMP.g⁻¹. Das 25 cepas do gênero *Listeria* isoladas, 24% (6/25) foram classificados como *L.*

monocytogenes, 52% (13/25) *L. innocua*, 16% (4/25) *L. welshimeri/L. seeligeri* e 8% (2/25) *L. grayi*. Em um dos queijos amostrados foi observado isolamento concomitante das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

A sorotipificação dos seis isolados de *L. monocytogenes* realizada na Fundação Instituto Oswaldo Cruz indicou a presença dos sorovares 1/2a (n=2), 1/2b e 1/2c (n=2), em uma cepa de *L. monocytogenes* não foi possível a sorotipificação. O perfil de PFGE demonstrou cinco pulsotipos (A, B, C, D e E) entre as seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir das marcas de queijo C, P e Q. Sendo que, entre os pulsotipos encontrados, foi possível observar um pulsotipo com dois isolados agrupados apresentando 100% de similaridade. Estes dois isolados foram obtidos a partir de queijos comercializados em dois pontos de coleta no mercado público (Figura 9).

Figura 9 - Perfis de PFGE encontrados em seis cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em queijos coloniais.



Na Tabela 11 está apresentado os parâmetros microbiológicos dos 25 queijos com presença do gênero *Listeria* sp. nos quais, foi possível observar violação, simultânea, a pelo menos um dos parâmetros microbiológicos quantitativos estabelecidos pela legislação em 60% (15/25).

Limites acima do aceitável pela legislação foram observados em 24% (6/25) dos queijos positivos para *Listeria* sp. tanto para *Staphylococcus* coagulase positiva quanto para coliformes termotolerantes. Em relação a *L. monocytogenes*, entre os seis queijos positivos para esta espécie, a maioria (n=5) estavam disponíveis para comercialização no mercado público e, estavam distribuídos entre três marcas: P(n=3); C (n=2) e Q (n=1). Entre estes, em dois foi observada violação, concomitante, a quantificação de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positivo.

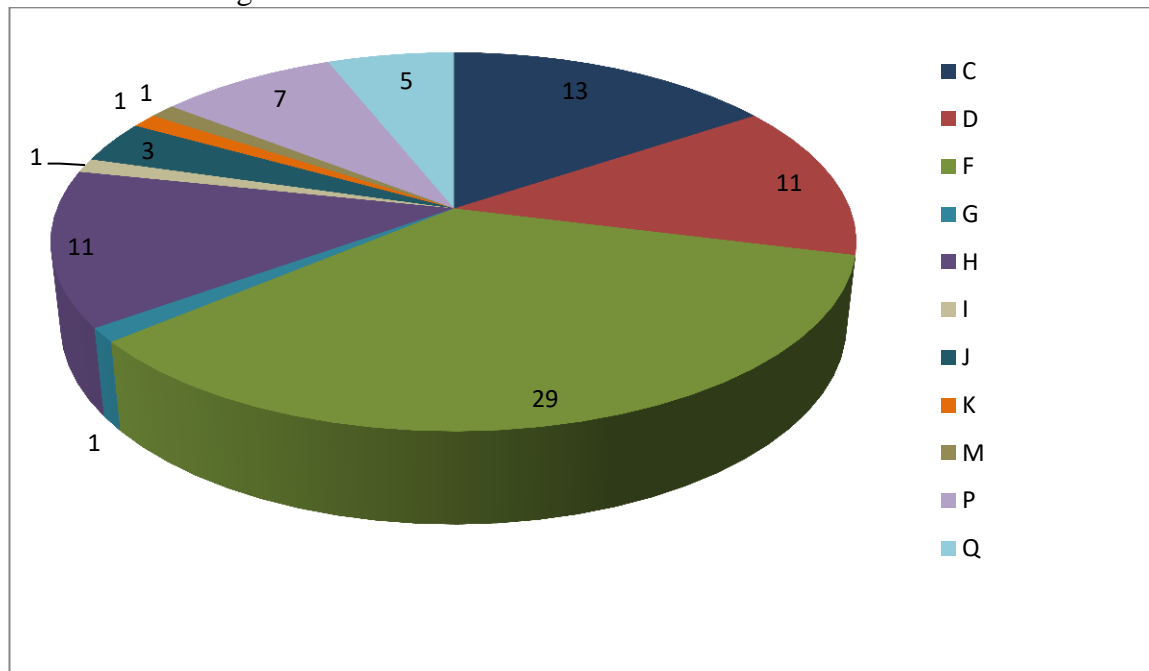
Tabela 11 - Características observadas em 25 cepas de *Listeria* sp. isoladas a partir de queijos coloniais comercializados em feiras e mercado público de Porto Alegre.

Ponto de amostragem	Marca	Coliformes termotolerantes	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	Espécie de <i>Listeria</i>	Sorotipo	Perfil PFGE
		NMP.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹			
F	C	20	2,1x10 ^{3*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	C	<3,0	4x10 ²	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	E
F	F	>1100*	1,1x10 ^{4*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	F	75	1,72x10 ^{4*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	F	3	1,24x10 ^{3*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	F	35	2,5x10 ^{3*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	J	20	6,98x10 ^{5*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	J	<3,0	<10	<i>L. innocua</i>	-	-
F	K	>1100*	4x10 ^{4*}	<i>L. innocua</i>	-	-
F	M	<3,0	<10	<i>L. grayi</i>	-	-
F	M	<3,0	<10	<i>L. grayi</i>	-	-
F	M	<3,0	<10	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	-	-
F	O	>1100*	<10	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	-	-
M	C	120	<10	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	-	-
M	C	3,6	<10	<i>L. monocytogenes</i>	-	C
M	C	1100*	5,6x10 ^{3*}	<i>L. innocua</i>	-	-
M	F	>1100*	7,5x10 ^{5*}	<i>L. innocua</i>	-	-
M	F	64	8,49x10 ^{5*}	<i>L. innocua</i>	-	-
M	F	1100*	3,5x10 ^{5*}	<i>L. innocua</i>	-	-
M	F	6,1	1,75x10 ^{6*}	<i>L. innocua</i>	-	-
M	L	290	<10	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	-	-
M	P	1100*	<10	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	A
M	P	3,6	<10	<i>L. innocua</i>	1/2c	D
M	P	1100*	3,9x10 ^{4*}	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	B
M	Q	6,1	<10	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	C

4.4 Caracterização de *Staphylococcus aureus*

Dos 83 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva selecionados para confirmação genotípica da espécie *S. aureus* a partir da amplificação do gene *nuc*, todos foram identificados como sendo cepas de *S. aureus*. As cepas eram oriundas de queijos coletados em 14 pontos (8 de Feiras Modelo e 6 do Mercado Público) e de 64,7% (11/17) das marcas de queijos amostradas (Figura 10). Deste total 68,67% (57/83) foram isolados de queijos amostrados em feiras modelos enquanto, 31,32% (26/83) foram isolados de queijos comercializados no mercado público. Sendo que, entre estes 83,13% (69/83) foram oriundos de queijos que apresentaram contagens que violaram o limite permitido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e 16,86% (14/83) de amostras dentro dos padrões da legislação (Apendice A).

Figura 10 – Distribuição de 83 cepas de *S. aureus* isolados a partir de 11 marcas de queijos comercializados no mercado público e feiras modelo de Porto Alegre.



As 83 cepas de *S. aureus* foram avaliadas quanto ao perfil de resistência antimicrobiana a partir da determinação da CIM pelo Método de Microdiluição em Caldo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Para todos os testes realizados, as cepas controle de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922 apresentaram valores de CIM dentro dos parâmetros estabelecidos pelo CLSI (Tabela 5A – CLSI, 2016). Ainda, em todas as contagens em placa das suspensões das cepas padrões realizadas, foi certificada a concentração de 2 a 8×10^5 UFC por mililitro e, conseqüentemente, garantida a correta diluição dos microrganismos.

Os valores de CIM50 e CIM90 determinados frente a oito antimicrobianos demonstraram que para seis deles 50% e 90% dos isolados foram inibidos por concentrações bem inferiores ao ponto de corte estabelecido para resistência (Tabela 12). Para eritromicina, 90% das cepas testadas foram inibidas por concentrações de 4 $\mu\text{g/mL}$, superior ao *breakpoint* de resistência (4 $\mu\text{g/mL}$). De forma similar no caso de penicilina, concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ foram necessárias para inibir 90% das cepas, enquanto o *breakpoint* de resistência é de 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Em ambos os casos, 50% das cepas ainda foram inibidas por concentrações de eritromicina e penicilina abaixo do *breakpoint*.

Na avaliação em termos de frequência de cepas de *S.aureus* resistentes aos antimicrobianos, observou-se que todas as cepas foram suscetíveis a cefoxetina, oxacilina e vancomicina. Frente aos demais antimicrobianos testados, foram detectadas cepas resistentes: penicilina (26,5%); ciprofloxacina (9,63%); eritromicina (9,63%); tetraciclina (7,22%) e gentamicina (4,81%). Do total de cepas, 55 (66,26%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos analisados e 5 (6,02%) foram resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes distintas, sendo consideradas multi-resistentes (Tabela 12).

A aplicação dos valores de ECOFF na avaliação qualitativa dos mesmos resultados de CIM (Tabela 12) demonstrou coincidência da frequência de resistentes e de cepas “não-wild type”(nWT) para seis antimicrobianos. Exceto para eritromicina (9,63% resistentes e 13,25% nWT) e vancomicina (0 resistente e 2,4% nWT) as frequências de nWT foram maiores do que de cepas resistentes.

A capacidade de produção de beta-lactamases foi investigada fenotipicamente por meio do teste em ágar preconizado pelo CLSI (2016). Em 26,5% (22/83) das cepas de *S. aureus* o teste resultou em positivo para produção de beta-lactamases. Todas as cepas que foram classificadas como resistentes pela determinação do CIM foram

positivas no teste de produção de beta-lactamases e as cepas suscetíveis foram negativas nesse teste. Adicionalmente, a presença do gene *blaZ* foi investigada, estando presente em 31,32% (26/83) das cepas, englobando todas as cepas fenotipicamente resistentes e quatro cepas que foram inibidas por concentrações de penicilina limítrofes ao *breakpoint* de resistência apresentando CIM igual a 0,125 µg/L (Tabela 12).

As 83 cepas de *S.aureus*, as quais foram suscetíveis na determinação do CIM à oxacilina, foram igualmente negativas na detecção do gene *mecA*, confirmando os resultados fenotípicos.

Tabela 12 – Resultado da Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos isolados de *Staphylococcus aureus* frente aos diferentes antimicrobianos avaliados.

ATM ^a	Frequência (%) de isolados com CIM (µg/mL) igual a:														MIC50	MIC90
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
CFX	-	-	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	-	-	4	4
CIP	0	0	25,3	39,75	24,09	1,2	-	1,2	6,02	2,4	0	-	-	-	0,25	0,5
ERY	0	0	6,02	56,62	22,89	1,2	2,4	1,2	1,2	4,81	1,2	0	2,4	0	0,25	4
GEN	0	0	1,2	18,07	44,57	28,91	2,4	0	0	2,4	2,4	-	-	-	0,5	1
OXA	0	2,4	34,93	24,09	16,86	21,68	0	0	0	0	0	-	-	-	0,25	1
PEN	49,39	13,25	10,84	0	3,61	2,4	3,61	3,61	7,22	3,61	2,4	0	0	0	0,06	8
TET	0	1,2	77,1	3,61	1,2	9,63	0	0	0	1,2	6,02	0	0	0	0,125	1
VAN	0	0	0	0	9,63	50,6	37,34	2,4	0	0	0	-	-	-	1	2

a Antimicrobianos (ATM) avaliados: cefoxetina (CFX), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERY), gentamicina (GEN), oxacilina (OXA), penicilina (PEN), tetraciclina (TET), vancomicina (VAN).

As linhas verticais sólidas indicam os valores de *breakpoint* clínicos e as linhas verticais pontilhadas indicam os valores de ECOFF, quando diferentes dos valores *breakpoint* clínicos correspondentes.

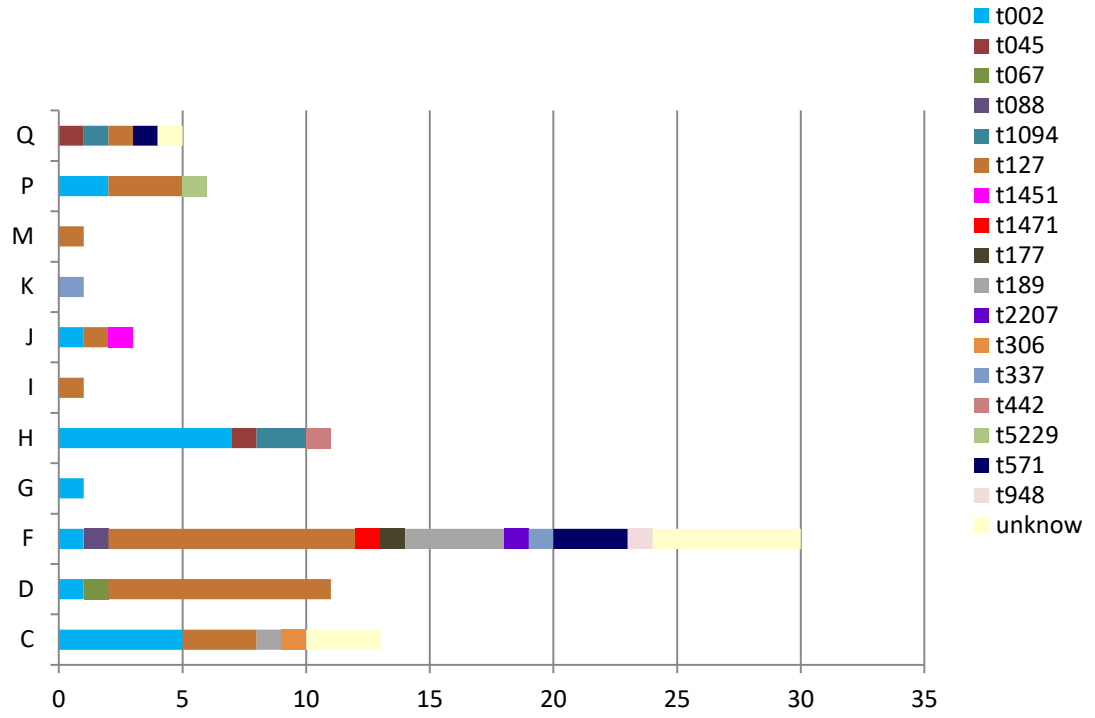
As concentrações não incluídas no painel de teste encontram-se tracejadas.

As cepas de *S.aureus* foram investigadas quanto à presença de genes codificadores de fatores de patogenicidade: Leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) e enterotoxinas (SE) clássicas. Todas as cepas foram negativas para o gene *lukS-F*, demonstrando que não eram capazes de produzir PVL.

Quanto à presença dos genes codificadores para SEs clássicas, 16,86% (14/83) amplificaram algum gene para SAgS (Apendice A). Os genes *seaA* (8/14) e *seaC* (6/14) estavam presentes enquanto os demais (*seaB*, *seaD* e *seaE*) não foram detectados. Todas as cepas de *S. aureus* em que foi detectada a presença de *seaA* e *seaC* foram isoladas a partir de queijos apresentando contagem acima do estabelecido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva . O gene *seaA* foi detectado em queijos da marca C (n=3), D (n=1), F (n=2) e H (n=2). O gene *seaC* foi detectado em queijos da marca D (n=2), F (n=1), H (n=1), P (n=1) e Q (n=1).

A partir da tipificação molecular das 83 cepas de *S. aureus* pela técnica de *spa typing* foi possível detectar 19 *spa typing* diferentes entre as 11 marcas de queijos comercializados: t127 (n = 29, 34,93%); t002 (n = 18, 21,68%); t189 (n = 5, 6,02%); t571 (n= 4, 4,81%); t1094 (n= 3, 3,61%); t045 e t337 (n= 2, 2,40%); t067, t088, t1451, t1471, t177, t2207, t306, t442, t5229 e t948 (n= 1, 1,20%); e as seguintes sucessão de repetições 03-16-21-17-23-13-17-17-23-24 e 03-16-21-17-23-13-17-17-24 (n= 5, 6,02%) classificadas como *unknown* pelo fato de não estarem cadastradas no banco de dados do servidor *Ridom spa typing* (Figura 11).

Figura 11 – Distribuição das cepas de *S.aureus* isoladas de queijo colonial de diferentes marcas de acordo com a classificação por *spa type*.



O perfil de características dos dois *spa type* mais frequentes entre os *S. aureus* isolados de queijo colonial está demonstrado na Tabela 13.

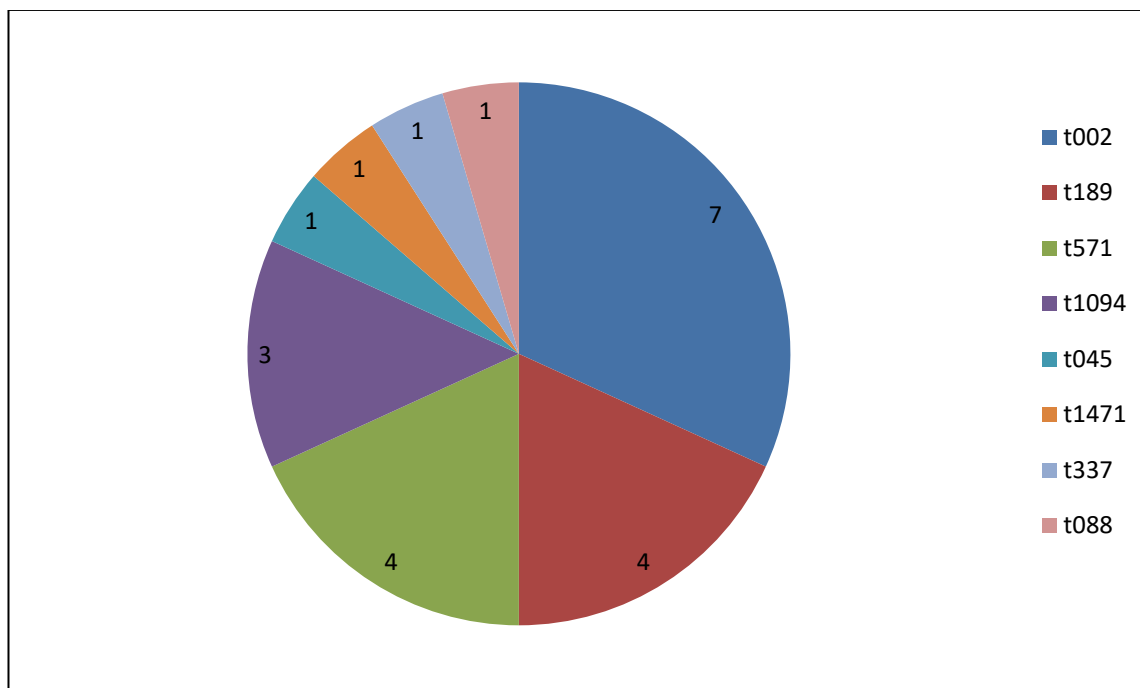
Tabela 13 – Características observadas nos *spa type* mais frequentes entre os isolados de *S. aureus* de queijos coloniais.

Características	Spa type	
	t127 (n=29)	t002 (n=18)
Origem do queijo	Mercado (34,5%); Feiras(65,5%)	Mercado (33,3%), Feiras (66,7%)
Marca do queijo	F(34,5%); D (31,0%), Outras (34,5%)	H (38,9%), C (27,8%), Outras (33,3%)
Perfil de resistência a antimicrobianos	ERY (3,4%), Suscetível (96,6%)	PEN-ERY (16,7%), PEN (22,2%), ERY (5,5%) Suscetível (55,6%)
Perfil de enterotoxinas	seC (10,3%), nenhuma (89,7%)	seA (16,7%), seC (11,1%), nenhuma (72,2%)

ERY=eritromicina; PEN= penicilina

Os *spa type* mais frequentes entre cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina foram t002, t189 e t571 (Figura 13), não havendo um predomínio de um *spa type*. Entretanto, todas as quatro cepas de *S.aureus* pertencentes ao *spa type* t571 apresentaram o perfil de tetra-resistência (CIP-GEN-PEN-TET), representando a totalidade das cepas que apresentaram esse perfil (Apêndice A). As quatro cepas de *S.aureus* t571 foram isoladas de queijos de três marcas distintas (F,P,Q) amostrados no Mercado Público (n=3) e Feira Modelo.

Figura 13 - Distribuição das cepas de *S.aureus* resistentes à penicilina isoladas de queijo colonial de acordo com a classificação por *spa* type.



Foram detectados três diferentes tipos de sequências (ST) nas quatro cepas de *S. aureus* selecionadas para tipificação pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) realizada *in silico*: ST-133, ST-5 e ST-1 (Tabela 14). A partir do sequenciamento do genoma total destes quatro isolados foi possível realizar pesquisas moleculares adicionais nas quais foi detectado além de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (*norA* – bomba de efluxo fluorquinolonas; *ant(6)-Ia*, *aph(3')* – aminoglicosídeos; *blaZ* - β -lactâmicos; *msr(A)*, *mph(C)* – macrolídeos) e o gene que codifica para enterotoxina clássica C (*sec*)(Tabela 14).

Tabela 14 - Perfis de MLST, genes de resistência e enterotoxinas clássicas detectados em quatro isolados de *S. aureus*.

Amostra	Genotipagem		Fatores de virulência		
	MLST	<i>spa type</i>	Genes de resistência	Enterotoxinas	Fenótipos resistência
12	ST - 133	unknown	<i>nor(A)</i>	-	-
50	ST - 133	unknown	<i>nor(A)</i>	-	-
68	ST - 5	t002	<i>ant(6)-Ia, aph(3'), blaZ, norA, msr(A), mph(C)</i>	<i>seaC</i>	PEN, ERY
133	ST - 1	t0027	<i>nor(A)</i>	-	-

MLST: *Multilocus Sequence Typing*; ERY: eritromicina; PEN: penicilina; *unknown*: *spa type* não existente na base de dados disponível em Ridom SpaServer em <http://www.spaserver.ridom.de/>.

5 DISCUSSÃO

A produção de alimentos inócuos, aptos ao consumo humano, é de extrema importância tanto à saúde pública quanto para atividade econômica. O queijo colonial é tipicamente consumido no Rio Grande do Sul, desta maneira o controle da qualidade higiênico-sanitária e microbiológica deste alimento é essencial para saúde da população.

No presente estudo, pode se observar um número elevado de queijos coloniais (47,31%) não conformes com pelo menos um dos parâmetros microbiológicos estabelecidos na legislação vigente para este alimento, portanto estavam impróprios ao consumo humano. Apesar dos queijos analisados terem sido elaborados em estabelecimentos fiscalizados por órgãos oficiais e comercializados em pontos de venda regulares e licenciados pelas autoridades sanitárias, os resultados evidenciaram que há necessidade de melhorar a qualidade desse produto quer seja a matéria-prima, instalações, higiene de equipamentos e utensílios, capacitação de funcionários, distribuição, transporte, armazenamento e comercialização dos queijos. Ocorrer falhas em alguma dessas etapas, pode tornar o queijo um risco ao consumidor pela possível presença de contaminantes microbiológicos (ROOS *et al.*, 2005). Por ser um alimento muito rico e completo em valores nutricionais, o queijo é ambiente propício para o desenvolvimento microbiano. Adicionalmente, tem que ser considerado que o queijo colonial é muito apreciado pelo consumidor gaúcho, que o consome, muitas vezes, sem tratamento térmico.

De todos os parâmetros microbiológicos analisados, apenas em relação à detecção de *Salmonella* sp. não foram detectadas violações, corroborando com Yamaguchi *et al.* (2013) que não detectaram positividade para *Salmonella* sp. em 227 amostras de queijo analisadas (mussarela, prato e minas frescal). Da mesma forma, Pinto *et al.* (2011), Lucas *et al.* (2012), Ribeiro *et al.* (2012), Melo *et al.* (2013), Leite Júnior *et al.* (2013), Apolinário *et al.* (2014), Amorim *et al.* (2014), não detectaram a presença de *Salmonella* sp. em amostras de queijo analisadas no Brasil. Segundo Andrade *et al.* (2006), a ausência de *Salmonella* sp. pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas que tornam o queijo um meio adverso à sobrevivência desses microrganismos, acidificando-o e desfavorecendo a sua multiplicação (PINTO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2013).

Entretanto, há inúmeros relatos de isolamento de *Salmonella* sp. a partir de queijo minas frescal, coalho e colonial, principalmente, em situações onde houve

utilização de leite cru, manipulação e hábitos higiênicos deficientes ou pela pasteurização inadequada da matéria prima utilizada na fabricação do queijo (BORGES *et al.*, 2010). Antonello, Kupkovski e Bravo (2012), que avaliaram a qualidade microbiológica de quatro diferentes marcas de queijo colonial comercializadas em supermercados na cidade de Francisco Beltrão, no Paraná, indicaram que 17,85% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* sp. Peresi *et al.* (2001) analisaram amostras de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, e identificaram *Salmonella* sp. em duas amostras produzidas artesanalmente. Assim como, Grandi e Rossi (2007), analisando queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, verificaram uma das vinte amostras analisadas com a presença de *Salmonella* sp., Castro *et al.* (2013), em estudo realizado em queijos mussarela observou presença de *Salmonella* sp. em 33,3% das amostras.

Muito embora haja relatos de *Salmonella* em produtos lácteos, principalmente fabricados de maneira artesanal (DUARTE *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2008), o queijo não é o principal alimento envolvido em surtos de salmonelose. Em países como França, Canadá, Dinamarca, Escócia, Estados Unidos, Holanda, Suécia, Inglaterra e País de Gales, de um total de 60 surtos estudados, *Salmonella* sp. foi responsável por 29 destes, sendo leite e derivados envolvidos em 1 a 5 % (DE BUYSER *et al.*, 2001). No Brasil, dos surtos investigados entre 2007 e 2017, em 2,8% leites e derivados estiveram envolvidos (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Ao contrário, o gênero *Listeria* foi detectado em 12,19% (25/205) dos queijos coloniais amostrados; deste total, 24% foram classificados como *L. monocytogenes*, 52% *L. innocua*, 16% *L. welshimeri/L. seeligeri* e 8% *L. grayi*. Em um dos queijos amostrados foi observado isolamento concomitante das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Apesar de diversas formas de transmissão do microrganismo em humanos já terem sido relatadas, a via alimentar parece ser a mais importante (ORSI *et al.*, 2011; LINKE *et al.*, 2014; EFSA, 2017), alimentos são apontados como causa de listeriose em 99% dos casos em humanos. Apesar de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* serem patogênicas para animais, apenas raros casos de infecção por *L. ivanovii* são relatados em humanos (HITCHINS *et al.*, 2002; CHAMBEL *et al.*, 2007). Assim, *L. monocytogenes* é a espécie investigada no âmbito da inocuidade dos alimentos. Entretanto, a presença de outras espécies de *Listeria* pode ser interpretada como indicativo de condições adequadas para a presença da espécie patogênica (ORSI *et al.*,

2011; LAMACO *et al.*, 2015), portanto seu isolamento pode ser considerado um risco no ambiente de laticínios e derivados lácteos.

Os queijos, entre os derivados lácteos são os que apresentam maiores ocorrências de contaminação por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e de média umidade, fatores como temperatura, atividade de água e pH nestes alimentos mostram ter impacto na virulência do agente (ANDERSEN *et al.*, 2007; DUODU *et al.*, 2010; WALECKA *et al.*, 2011; NIC AOGAIN & O'BYRNE, 2016). Tanto a contaminação da matéria prima quanto a contaminação cruzada durante o processamento do alimento podem ter efeito na prevalência e na concentração de *L. monocytogenes* no produto final (WAGNER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2011; FOX *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013; HOLCH *et al.*, 2013; PARESI *et al.*, 2013; TENENHAUS-AZIZA *et al.*, 2014). Em queijos maturados produzidos com leite pasteurizado, como é o caso do queijo em estudo, a contaminação cruzada e a re-contaminação durante a fabricação do produto implicam na presença de *Listeria* sp. (MULLAN *et al.*, 2009; TENENHAUS-AZIZA *et al.*, 2014). Pradhan *et al.* (2011) cita que práticas de varejo também podem resultar na contaminação cruzada do alimento assim como, o armazenamento do produto durante longos períodos sob refrigeração (REDMOND, 2016), o que permite o seu desenvolvimento. Estas hipóteses são compatíveis com o resultado obtido no presente estudo uma vez que, os queijos analisados eram elaborados a partir de leite pasteurizado, indicando desta maneira a possível contaminação pós-processamento do alimento.

L. monocytogenes tem sido isolada de diversos tipos tradicionais de queijos em diversos países, em frequências variáveis (Pintado *et al.*, 2005). A bactéria foi isolada em 6,4% (21/329) das amostras de queijos moles oriundas de países da Europa e, importante ressaltar, foi verificada maior ocorrência nos queijos elaborados com leite pasteurizado do que nos queijos fabricados com leite cru (RUDOLF; SCHERER, 2001), indicando que a contaminação pode ocorrer durante o processamento na indústria. Em setembro de 2012 ocorreu um surto de listeriose veiculado por queijo contaminado com *L. monocytogenes* em 11 diferentes estados dos EUA com 14 pessoas infectadas contabilizando três mortes (WONG, 2013), demonstrando a importância desse patógeno para saúde pública.

O resultado obtido no presente estudo concorda com o que foi relatado em outros estudos no Brasil. Sousa *et al.* (2006) relataram que dentre 70 amostras de queijo coalho, 17% apresentavam o patógeno. Da Silva *et al.* (2011) analisando diferentes

tipos de queijos no país, encontraram o agente variando de 0 a 48,3%, no período compreendido entre 2000 e 2009, com predomínio em queijo minas frescal. Schwab *et al.* (1996), no Rio Grande do Sul, conseguiram isolar *L. monocytogenes* e *L. innocua* de amostras de queijos coloniais comercializados em Porto Alegre assim como, Zaffari *et al.* (2007), que analisou seis amostras de queijo tipo ricota no Rio Grande do Sul, e em três encontraram *L. monocytogenes*. Casarotti *et al.* (2011) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal comercializado no município de Piracicaba, São Paulo. Por outro lado, muitos pesquisadores não isolaram esse patógeno em leite cru ou em produtos lácteos (PADILHA *et al.*, 2001; NERO *et al.*, 2004; ARCURI *et al.*, 2006; CAMARGO, 2010; FAVA *et al.*, 2012; TAMANINI *et al.*, 2012).

A variação observada na ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos entre os estudos pode ser explicada pelo uso de diferentes métodos para a detecção do microrganismo, diferença de padrões de qualidade dos queijos, utilização de leite cru ou pasteurizado como matéria prima na elaboração do produto. A amostragem representativa constitui também fator importante na detecção deste patógeno, uma vez que a análise de poucas amostras aumenta a probabilidade de não encontrar *L. monocytogenes* e esse resultado não significa, necessariamente, que o microrganismo não esteja presente no lote. No presente estudo, a amostra foi calculada para ter 99% de chance de encontrar ao menos uma amostra positiva, considerando o total de queijos comercializados nos pontos de venda num dado momento. A escolha de amostrar produtos comercializados em feiras modelo e no Mercado Público, visou obter uma amostra representativa de onde o queijo colonial era mais disponibilizado para o consumidor. Traçar o perfil desse consumidor e a forma como ele consome queijo colonial poderá contribuir para analisar o risco desse produto no futuro. Apesar da frequência de *L. monocytogenes* observada nos queijos (2,92%) analisados, é evidente que a ocorrência de listeriose em humanos depende de propriedades inerentes ao agente como a dose infectante e a virulência da linhagem e, acima de tudo, de uma população consumidora de alimentos prontos para consumo, portadora de fatores predisponentes (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Desta maneira, o risco de desenvolver infecção após a ingestão de um produto contaminado, é particularmente perigoso para indivíduos pertencentes aos grupos de risco tais como: gestantes, idosos e imunocomprometidos; e baixo para indivíduos saudáveis (SCALLAN *et al.*, 2011).

O critério adotado para *L. monocytogenes* em vários países é a “tolerância zero”, ou seja ausência em 25 gramas de alimento. Este mesmo critério não é adotado em

países como Canadá e França, que toleram a presença de 100 UFC/g em alguns alimentos (THENOVET *et al.*, 2006). Independente da legislação do país, a análise de risco de um dado alimento para o consumidor necessita de informação a respeito do número de bactérias presente para, em conjunto com dados de consumo e de dose infectante, permitir acessar o risco. Por essa razão, as amostras positivas para *Listeria* sp. foram analisadas por um protocolo que permitia estimar as bactérias desse gênero. Constatou-se que o número de *Listeria* sp. foi muito baixa, sendo que todas as amostras com isolamento de *L. monocytogenes* apresentaram contagens inferiores à capacidade de quantificação da técnica (3NMP.g⁻¹). Mesmo considerando a realidade de sub-notificação das DTAs no Brasil e a pouca investigação de *L.monocytogenes* em surtos, o baixo número do patógeno encontrado nas amostras positivas talvez justifique a baixa frequência de casos de listeriose registrados na região do estudo.

A presença de *Listeria* nos queijos não estava necessariamente associada a violações de outros parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente, demonstrando que nem sempre condições higiênico-sanitárias precárias necessitam estar presentes para haver contaminação por esse patógeno. Ao contrário, os coliformes parecem exercer influência negativa na população desse microorganismo em queijos, impedindo sua proliferação, podendo inclusive dificultar sua detecção (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2006). As bactérias ácido lácticas também podem influenciar no comportamento de *L. monocytogenes* (NALDINI *et al.*, 2009; NERO *et al.*, 2009). O controle de *L. monocytogenes* na indústria é dificultado pelo fato da bactéria ser de origem ambiental, não havendo correlação entre a presença da bactéria e de microrganismos indicadores higiênico-sanitários, como coliformes e *Escherichia coli*. Esse é um problema particularmente grave para os laticínios, já que usualmente são esses os indicadores utilizados no controle de qualidade microbiológica de ordenha, da eficiência da pasteurização e da sanidade de derivados, como queijos. Assim, há necessidade da investigação de *L. monocytogenes* em produtos e amostras de ambiente para o controle efetivo do patógeno nas indústrias de laticínios (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os seis isolados de *L. monocytogenes* do presente estudo foram classificados em três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 1/2c. Esses sorotipos são os mais frequentemente isolados de alimentos e ambientes relacionados com a produção de alimentos (SWAMINATHAN: GERNER-SMIDT, 2007). Além disto, no Brasil, o sorotipo 1/2a tem sido o mais frequentemente isolado de produtos lácteos (HOFER *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2008;

ABRAHÃO *et al.*, 2008; DE NES *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2003), a partir de dois isolados de *L. monocytogenes* encontrados em laticínios na Bahia, constataram que um era do sorotipo 1/2a e o outro 4b. Brito *et al.* (2008), de 344 isolados provenientes de um único laticínio em Minas Gerais, verificaram que todos pertenciam ao sorotipo 1/2a. Figueiredo (2000) encontrou o predomínio dos sorotipos 4b (39,13%), além de 1/2b, 1/2a e 1/2c em amostras provenientes da linha de processamento de leite pasteurizado. Na Itália, pesquisa em 22 indústrias produtoras de queijo, de 95 isolados de *L. monocytogenes*, 88% pertenciam ao sorotipo 1/2a (LOMANACO *et al.*, 2009). Na Índia, Aurora *et al.* (2009) observaram que de 18 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de leite e derivados lácteos, 72,2% pertenciam aos sorotipos 4b, 4d e 4e; 22% sorotipos 1/2b e 3b; 5,5% 1/2a e 3a. Wang *et al.* (2015) na China, observaram que entre 33 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em alimentos 48,5% pertenciam aos sorotipos 1/2b e 3b; 45,5% sorotipos 1/2a e 3a; 6,1% a 1/2c e 3c.

Dentre os sorotipos encontrados em nosso estudo, 1/2a, 1/2b têm sido relacionados a infecções humanas e, juntamente com sorotipo 4b são responsáveis por 98% dos casos relatados no mundo (GRAVES *et al.*, 1999; ROCOURT *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 2010; ORSI *et al.*, 2011; EFSA, 2017). Na Europa, *L. monocytogenes* implicou em 525 casos de listeriose no período entre 2008 e 2015 (EFSA, 2017), entre estes, o queijo foi apontado como responsável em 8,4% (44), envolvido em quatro surtos, nos quais os sorotipos 1/2a e 1/2b foram predominantes (SILK *et al.*, 2014). No Brasil, de acordo com Hofer *et al.* (2006), os sorotipos mais frequentemente encontrados nos casos de listeriose em humanos são 1/2a e 4b. Por outro lado, 1/2c, observado em duas amostras, aparece esporadicamente em casos de listeriose em humanos. Nos alimentos, a presença do sorotipo 1/2c pode estar associada à capacidade de aderência a superfície de aço inoxidável, muito utilizado em ambientes de processamento de alimentos, permitindo que cepas residentes permaneçam por longos períodos neste ambiente e contaminem os produtos em contato (LUNDÈN *et al.*, 2002; THENOVET *et al.*, 2006) além disto, os sorotipos 4b e 1/2b são bons formadores de biofilme (DJORDJEVIC *et al.*, 2002; CHAE *et al.*, 2006), apresentando impacto negativo para a indústria de laticínios bem como no contexto de saúde pública.

Os métodos de genotipagem têm sido utilizados na avaliação da contaminação microbiana na indústria de alimentos, em vários estudos (TOMPKIN, 2002; KELLS; GILMOUR, 2004; AURORA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016). O PFGE é considerado padrão ouro na subtipagem de *L. monocytogenes*, apresentando

alto poder discriminatório entre as cepas (GRAVES *et al.*, 2001; HEIR *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 2007). Esta ferramenta possibilita observar a permanência de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento como microbiota residente por meses ou até anos. Na Suécia, uma cepa de *L. monocytogenes* sorotipo 3b persistiu durante sete anos em uma planta de processamento de queijo (WAAK *et al.*, 2002). Na Suíça, uma cepa do sorotipo 4b permaneceu 11 meses no ambiente de processamento de queijo de leite de cabra, enquanto outra cepa desse mesmo sorotipo persistiu durante quatro anos em uma planta de processamento de queijo no Reino Unido (TOMPKIN, 2002). Na Suécia, Waak *et al.* (2002) relataram a persistência dessa bactéria em tanques de leite das fazendas e silos de armazenamento de leite, provenientes de uma indústria de laticínios. No presente estudo, os isolados de *L. monocytogenes* foram genotipificados por macrorestrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) no qual pode se observar cinco pulsotipos entre as seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir das marcas de queijo C, P e Q. As duas cepas que apresentaram o pulsotipo em comum eram provenientes de queijos de diferentes marcas e comercializadas em diferentes bancas do Mercado Público, demonstrando que não havia uma relação epidemiológica evidente entre elas.

Frente aos parâmetros microbiológicos quantitativos que incluem a enumeração de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva foram observadas violações, indicando desvios de higiene na elaboração dos queijos coloniais. Em relação à quantificação de coliformes termotolerantes, 10,73% das amostras apresentaram contagens superiores ao limite máximo estabelecido na legislação de 10^3 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C sendo que não foi observada associações significativas entre o tipo de estabelecimento de comercialização e quantificação de coliformes termotolerantes, tampouco foram encontradas diferenças significativas entre as marcas amostradas. Os coliformes termotolerantes além de utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos são também empregados como indicadores de falhas higiênico-sanitárias dos processos de fabricação (BRASIL, 2001; SILVA *et al.*, 2010; OLANARIN *et al.*, 2011).

Frequências superiores frente aos coliformes termotolerantes foram observadas em queijos coloniais no sul do país com 41,7% e 50% das amostras de queijos apresentando resultados acima do preconizado na legislação (Lucas *et al.*, 2012; Adami *et al.*, 2015). Assim como estudo realizado por Feitosa *et al.* (2003), com queijo de coalho, que verificou que 36,4% das amostras estavam acima dos limites aceitáveis e

Apolinário *et al.* (2014) que observaram contagens de coliformes termotolerantes acima dos limites de referência em 54,8% dos queijos minas frescal produzidos e comercializados em Minas Gerais. Ide & Benedet (2001) observaram a qualidade do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, encontrando uma grande variação nos resultados. Das 20 amostras analisadas, 10 estavam contaminadas na faixa de $1,5 \times 10^6$ a $4,6 \times 10^7$ UFC/g de amostra e 10 na faixa de $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^5$ UFC/g de amostra. Zaffari *et al.* (2007) monitoraram a qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, dos 29 estabelecimentos, 27 comercializavam queijos que apresentavam contagens de coliformes fecais acima dos valores estabelecidos na legislação vigente. Várias pesquisas evidenciaram em queijos, coliformes termotolerantes em números acima do limite estabelecido pela legislação em nosso país, corroborando com resultados obtidos em nosso estudo (COSTA; OKURA & MOACIR; REZENDE *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2011; LUCAS *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014).

Microrganismos indicadores são rotineiramente utilizados para avaliar as condições de higiene tanto no processamento do alimento quanto no produto final. Vale ressaltar que, este grupo de microrganismos pode ser indicativo de contaminação fecal, uma vez que tem como habitat o trato digestório de homens e animais (Apolinário *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2016). A ocorrência de coliformes termotolerantes acima dos limites aceitáveis pela legislação (Brasil, 2001) em amostras de queijos produzida com leite pasteurizado, como é o caso do queijo em questão, pode estar relacionada à falha no processo de pasteurização ou à contaminação pós-processo em função do não cumprimento dos requisitos de BPF (SILVA *et al.*, 2010; OLANARIN *et al.*, 2011).

Porém, nos queijos coloniais avaliados no presente estudo, a ocorrência de coliformes termotolerantes acima dos limites aceitáveis pela legislação não foi a principal violação observada, tendo em vista que, 40,48% das amostras de queijo colonial apresentaram valores superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva (10^3 UFC.g⁻¹). Em média, a prevalência de não conformidade para *Staphylococcus* coagulase positiva foi 57% maior nas feiras do que no mercado ($p < 0,05$; RP=1,57; IC95%: 1,09 – 2,27). Porém, ao ajustar a estimativa do efeito do tipo de estabelecimento pela inclusão das marcas de queijo, o estabelecimento deixa de ser significativo ($p > 0,05$; RP=1,02; IC95%: 0,71 – 1,48) e algumas marcas tiveram diferenças significativas ao contrastarem-se umas com as outras. O resultado

sugere que o problema maior perante a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva nos queijos sejam relacionadas às marcas e que a falha está possivelmente no processo de elaboração do produto e não no armazenamento no varejo. Entre elas, “F” foi a marca de queijo que mais frequentemente apresentava essa não conformidade sendo que, na mesma marca, foram ainda observadas violações aos demais parâmetros avaliados (detecção de *Listeria* sp. e coliformes termotolerantes). Esta marca encontrava-se disponível para comercialização em 13 dos 15 pontos de amostragem, refletindo desta maneira elevado risco aos consumidores. Essa ampla distribuição de uma marca com grande número de violações chama a atenção para a necessidade de programas de monitoramento constantes por parte das autoridades sanitárias, quer seja na indústria quanto no comércio.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos é uma constante preocupação, o que pode estar relacionado ao fato de tratar-se de um produto bastante manipulado durante sua elaboração. Adami *et al.* (2015) observaram que 25% das amostras de queijos coloniais sob inspeção oficial no Rio Grande do Sul apresentaram *Staphylococcus* coagulase positiva em quantidades acima do estabelecido pela legislação. No Paraná, Lucas *et al.* (2012) relataram que 12,5% das amostras de queijo colonial estavam em desacordo com a legislação. Assim como Pinto *et al.* (2011), Komatsu *et al.* (2010) e Castro *et al.* (2012) que observaram *Staphylococcus* coagulase positiva em desacordo com a legislação em 25%, 88% e 100% das amostras, respectivamente. Aguilar *et al.* (2016) observaram *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites estabelecidos pela legislação em 16,6% e 88,3% dos queijos parmesão, ralados na indústria e no comércio varejista, em São Paulo. Valores iguais ou inferiores ao relatado neste estudo já foram descritos.

A investigação de *Staphylococcus* nos alimentos é de extrema importância, pois estes microrganismos são capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis (SEs) nos alimentos, causando surtos de intoxicação alimentar (Scallion *et al.*, 2011). Entre as espécies de SCP apenas três (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hycus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas associadas a surtos de intoxicação alimentar (GANDRA, 2006; SANTANA *et al.*, 2010). Essas espécies não são diferenciadas pelos procedimentos de rotina da análise de alimentos, por essa razão esse parâmetro é referido como *Staphylococcus* coagulase positiva, apesar de *S.aureus* ser o mais relevante do grupo no que se refere à inocuidade dos alimentos. O gene da termonuclease (*nuc*) tem sido utilizado com sucesso para identificação da espécie *S.*

aureus. De acordo com Sasaki *et al.* (2010) o método possui 99,8% de sensibilidade e 100% de especificidade. No presente estudo, a confirmação genotípica de *S. aureus* foi realizada pela amplificação do gene *nuc*, confirmando as 83 cepas, oriundas de queijos coloniais coletados em 14 pontos (8 de Feiras Modelo e 6 do Mercado Público), e demonstrando que essa é a principal espécie que contamina o queijo colonial.

Staphylococcus aureus é um patógeno ubíquo que está associado a várias doenças, tanto em humanos quanto em animais (ENRIGHT *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 2006; SIBBALT *et al.*, 2006; LOWDER *et al.*, 2009; QUINN *et al.*, 2011; PANTOSTI, 2012; PEACOCK; PATERSON, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016) aproximadamente 30% dos indivíduos saudáveis são portadores assintomáticos deste patógeno (De LEO, 2010; WENDLANDT *et al.*, 2013b). *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir mais de 30 fatores de virulência, principalmente, proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas (KROPEC *et al.*, 2005) que lhe permitem além da invasão direta dos tecidos a evasão do sistema imune, proliferação e sobrevivência no hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2007; OTTO, 2015), no entanto, a principal importância de *S. aureus* não está apenas relacionada ao fato de estar envolvido em infecções tanto em humanos quanto em animais, mas também ao risco que esta espécie representa em saúde pública devido a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis em alimentos (LAMAIA *et al.*, 2005; VIÇOSA *et al.*, 2010; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014 *et al.*, 2014) e veicular genes de resistência a antimicrobianos (RICH *et al.*, 2005; BEN SAID *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus é muito vulnerável à destruição por aquecimento e a agentes sanitizantes, portanto, sua presença em alimentos processados é, geralmente, indicativa de má higienização (CRAGO *et al.*, 2012). Considerando que a pasteurização do leite elimina as células viáveis de *S. aureus*, e pelas amostras de queijos coloniais analisadas nesta pesquisa terem sido produzidas a partir de leite pasteurizado, podemos sugerir que a contaminação possa ter ocorrido por falha na pasteurização do leite, pelos equipamentos mal higienizados, ou principalmente, pelo manipulador. O homem tem sido a principal fonte de contaminação de queijos por *S. aureus* (CALLON *et al.*, 2008), sendo o queijo um alimento bastante manipulado, a contaminação microbiana é facilitada.

A contaminação inicial da matéria prima por *Staphylococcus* pode ser um fator determinante para a segurança dos alimentos, considerando que, uma vez produzidas, as

enterotoxinas podem persistir no alimento mesmo após o tratamento térmico (Necidova *et al.*, 2016). Segundo Paulin, Horn e Hudson (2012), uma população entre 10^5 e 10^6 UFC.mL⁻¹ ou g é necessária para que *Staphylococcus aureus* seja capaz de produzir SEs. Já foram descritas mais de 22 enterotoxinas estafilocócicas (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Dentre elas, as enterotoxinas clássicas (SEA a SEE) são responsáveis pela maioria dos surtos investigados, sendo SEA a enterotoxina mais frequentemente relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus*, seguida por SED, SEC e SEB e, raramente, SEE (BALABAN; RASOOLY, 2000; VERNZOY-ROZAND, 2004; CREMONESI *et al.*, 2005; CHAVES, 2012; SATO'O *et al.* 2014). Estima-se que 95% dos surtos de intoxicação estafilocócica ocorrem devido à produção de SEs clássicas (OMOE *et al.*, 2002; CHAPAVAL *et al.*, 2006; ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013; NAGARAJ *et al.*, 2014 WU *et al.*, 2016). Com base nos dados da literatura, o presente trabalho deteve-se somente na pesquisa de SEs clássicas entre as cepas de *S. aureus* isoladas. A presença de genes codificadores para enterotoxinas clássicas foi confirmada em 16,86% das cepas de *S. aureus*, sendo *sea* o gene mais frequente, seguido por *sec*; os genes para as demais enterotoxinas B, D e E não foram detectadas.

A frequência de cepas carregando genes de enterotoxinas, neste estudo, pode ser considerada baixa se comparada com a presença de até 70% em *S. aureus* associados a surtos alimentares (ROSENGREN *et al.*, 2010; NUNES; CALDAS, 2017). Quanto ao tipo de enterotoxina, *sea* foi o gene mais frequente corroborando com estudos conduzidos em *S. aureus*. No queijo Minas, estudado por Rall (2010), a presença de SEA foi notada na maioria dos isolados, enquanto SEB esteve presente na maioria dos isolados (55 dos 263) de leite bovino analisados por Park *et al.* (2011). Estudo realizado por Filho *et al.* (2007) evidenciou que 91,7% das cepas de *S. aureus* oriundos de leite de animais com mastite apresentaram a produção de pelo menos um tipo de toxina, isoladamente ou em associação, revelando elevado grau de toxigenicidade. Borges *et al* (2008), na região metropolitana de Fortaleza (Ceará), constataram a presença dos genes *sea* e *sec* em amostras de queijo de coalho. Silva *et al* (2005) encontraram baixa frequência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas em leite de vacas com mastite; das 64 amostras isoladas, quatro (6%) apresentaram os genes *sea* e *seb* e apenas duas (3%) continham o gene *sec*. Veras *et al.* (2008) estudando 30 cepas de SCP e SCN, isoladas de produtos lácteos envolvidos em surtos de enfermidades alimentares ocorridos no

estado de Minas Gerais em um período de quatro anos, demonstraram que 38% das cepas carregavam somente o gene *sea*, 29% somente o gene *seb* e 24% *sea* e *seb*.

No entanto, conforme a matriz alimentar estudada, esse perfil pode ser diferente. Estudos têm demonstrado a relação entre a fonte de contaminação e o tipo de SEs produzida por *S. aureus*. SEA e SEB são associadas a contaminações de origem humana, isto é, contaminações cruzadas durante e após processamento (FUEYO *et al.*, 2005), enquanto SEC e SED, estão relacionadas com contaminações proveniente de animais, bovinos e suínos respectivamente (NÁJERA-SANCHEZ *et al.*, 2003; JORGENSEN *et al.*, 2005). A SEC é a mais frequente em isolados de leite, sendo relatada em vários estudos (ARGUDIN *et al.*, 2010; VALIHRACH *et al.*, 2013; CARFORA *et al.*, 2015). No presente estudo, nas cepas de *S. aureus* isoladas em que houve a detecção de genes de enterotoxinas, *sea* predominou, o que pode sugerir uma fonte humana das cepas isoladas. A detecção de *sec* em 7,2% das cepas, reforça a hipótese de que tenham ocorrido falhas na pasteurização ou recontaminação cruzada destes queijos uma vez que, este processo eliminaria os *S. aureus* provenientes do animal.

Ainda que a presença do gene seja um pré-requisito para que a bactéria produza enterotoxinas, sua presença, por si só, não indica a presença da toxina no alimento. Outros fatores como a concentração bacteriana, temperatura, pH, atividade de água são necessários para que haja expressão. Segundo Paulin; Horn; Hudson, (2012), é necessária uma população entre 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias por ml ou g (UFC/ml ou g) para que os estafilococos sejam capazes de produzir SEs. Além disso, existem diferenças entre os antígenos; por exemplo, a concentração bacteriana necessária para expressar SEA e SED pode ser menor do que a necessária para expressar as demais toxinas (BERGDOLL; WONG, 2006, TSUTSUURA; SHIMAMURA; MURATA, 2013). Entre as 14 cepas *S. aureus* em que foi detectada a presença de SEs, 78,6% foram isoladas a partir de queijos apresentando contagem acima do estabelecido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e em 28,6% destes isolados foi observado uma população de *Staphylococcus* coagulase positiva na ordem de 10^5 UFC.g⁻¹ de maneira que, pelo menos em termo de população bacteriana houve condições para produção da enterotoxina.

Os genes que codificam enterotoxinas podem ser expressos numa ampla faixa de temperatura, entre 10 e 45°C (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012), contudo a produção de SEA já foi observada em temperaturas inferiores a 10°C (TSUTSUURA;

SHIMAMURA; MURATA, 2013). Considerando a temperatura como um fator limitante para produção das enterotoxinas, Bastos (2013) testou sua expressão em baixas temperaturas (12° e 8°C) e percebeu a redução na expressão em temperatura de 8°C. A partir de modelos matemáticos, Nunes e Caldas (2017), avaliaram o risco associado à intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas após o consumo de queijo Minas frescal, considerando diferentes pH, concentração salina e temperatura de armazenamento. Os autores verificaram que a temperatura de armazenamento teve o maior impacto na taxa de crescimento e na fase de adaptação (LAG) do microrganismo. Sendo assim, o abuso de temperatura no armazenamento de alimentos prontos para o consumo (como, por exemplo, queijos) pode contribuir para a multiplicação bacteriana e, no caso de *Staphylococcus* sp. propiciar a produção de enterotoxinas. Portanto, embora a produção das enterotoxinas não seja totalmente inibida em baixas temperaturas, a manutenção da cadeia do frio é essencial para a conservação da qualidade microbiológica dos alimentos.

Apesar da tradicional comercialização da matriz em estudo em feiras-livres representar uma preocupação quanto à temperatura de conservação do produto, a maioria dos queijos analisados (89,7%) encontravam-se dispostos em equipamento com capacidade de refrigeração. Embora tenha sido observada uma tendência maior (14,9%) para a ausência de refrigeração nos produtos comercializados nas feiras, esta frequência foi considerada baixa, o que constitui um aspecto positivo. Ações de vigilância dos órgãos municipais e estaduais podem ter influenciado esses resultados, uma vez que esses estabelecimentos são frequentemente fiscalizados pelo poder público.

A mesma situação não foi relatada por Fava *et al.* (2012), que avaliando produto semelhante em feira agropecuária na cidade de Porto Alegre, encontrou 50% das amostras expostas em temperatura ambiente. A falta de refrigeração também foi observada em 71% dos queijos comercializados em bancas nas estradas do Litoral Norte Gaúcho (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007). Da mesma forma, considerando a faixa de temperatura recomendada para armazenamento de produtos lácteos refrigerados, 91,66% dos queijos analisados por Castro *et al.*, (2012), na Bahia, apresentaram-se em desacordo com a temperatura de comercialização (acima de 10°C).

Um fator determinante de patogenicidade de *Staphylococcus* está associado com sua resistência a antimicrobianos (YUCEL *et al.*, 2011; PEREIRA; CUNHA, 2013; RUARO *et al.*, 2013; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Desde a descoberta dos antimicrobianos, a resistência bacteriana tem sido um problema mundial. E o fato de

alimentos serem carreadores de bactérias resistentes chama atenção para o papel da cadeia alimentar na transmissão de microrganismos resistentes entre o ambiente e humanos (FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016). No presente estudo, 66,26% das cepas de *S. aureus* foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados não foram observados MIC de resistência a cefoxetina, oxacilina e vancomicina. Frente aos demais antimicrobianos testados foram detectadas baixas frequência de resistência sendo as maiores frequências observadas frente à penicilina (26,5%) fato este, que pode ser explicado devido ao emprego deste antimicrobiano em infecções do gado leiteiro (SAINI *et al.*, 2012; JAMALI *et al.*, 2013). Fenótipo de multirresistência foi observado em apenas 6,02% das cepas de *S. aureus*.

No presente estudo baixas frequências de resistência foram observadas, ainda, frente a ciprofloxacina e eritromicina (9,63%), tetraciclina (7,22%) e gentamicina (4,81%). Várias pesquisas em outros países demonstram percentuais baixos de resistência a eritromicina e/ou ciprofloxacina entre cepas de estafilococos corroborando com o presente estudo (SIBERRY *et al.*, 2003; NORMANNO *et al.*, 2007; YUCEL *et al.*, 2011). A partir de *S. aureus* isolados em queijos Rola *et al.* (2016) e Arefi *et al.* (2014) observaram fenótipo de resistência a eritromicina em 1,2% (1/122) e 12% (3/25), consecutivamente. No Brasil, André *et al.* (2008) não encontraram resistência a ciprofloxacina entre as cepas de *S. aureus* isoladas de queijo minas frescal e apenas uma cepa apresentou resistência a eritromicina. Muito embora tetraciclina seja empregada no tratamento de mastite em bovinos (SHI *et al.* 2010; GAO *et al.* 2012; ROLA *et al.* 2015) evento que poderia contribuir na resistência frente a este antimicrobiano a baixa frequência de cepas de *S. aureus* resistentes a tetraciclina foi observada no presente estudo. Assim como, Normanno *et al.* (2007), na Itália, não isolaram nenhuma cepa de *S. aureus* resistentes a tetraciclina a partir de leite bovino. André *et al.* (2008) observaram que 25% das cepas de *S. aureus* isoladas de queijo minas frescal apresentavam resistência a tetraciclina. Fenótipos de resistência a tetraciclina em *S. aureus* isolados de leite e derivados foram observados em 100%, 56,1% e 8,8 % das cepas estudadas por Kreasukon *et al.* (2012), Jamali *et al.* (2015) e Saini *et al.* (2012), respectivamente.

Gentamicina é um antibiótico eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana (LANGONI *et al.*, 2000). Vários autores têm demonstrado susceptibilidade à gentamicina a partir de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e alimentos (NORMANNO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001;

WATANABE *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; BYARUGABA, 2004), porém, altos índices de resistência a gentamicina já foram descritos (FREITAS *et al.*, 2005).

A capacidade de produção de beta-lactamases foi investigada fenotipicamente por meio do teste em ágar preconizado pelo CLSI (2016). Em 26,5% (22/83) das cepas de *S. aureus* o teste resultou em positivo para produção de beta-lactamases. Todas as cepas que foram classificadas como resistentes pela determinação do CIM foram positivas no teste de produção de betalactamases e as cepas suscetíveis foram negativas no teste. Adicionalmente, a presença do gene *blaZ* foi investigada, estando presente em 31,32% das cepas, englobando todas as cepas fenotipicamente resistentes e quatro cepas que foram inibidas por concentrações de penicilina limítrofes ao *breakpoint* de resistência apresentando CIM igual a 0,125 µg/L demonstrando uma tendência a resistencia. Esta frequência pode ser considerada baixa se comparada a estudos realizados com outros tipos de alimentos. Avaliando *Staphylococcus* isolados de produtos cárneos prontos para o consumo, Podkowik; Bystron; Bania (2012) obtiveram 92% de cepas positivas para a presença do gene *blaZ*. A resistência à penicilina também foi observada em 47% dos isolados de queijos na Turquia (KÜREKCI, 2016). André *et al.* (2008) observaram, a partir de 20 cepas de *S. aureus* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijos, em um laticínio em Goiás, 12 (60%) apresentaram resistência à penicilina. Yucel *et al* (2011), observaram que 92% das cepas de estafilococos isoladas de leite cru e queijo, na Turquia, apresentavam resistência a penicilina, resultados semelhantes também foram relatados por Souza (2005), Dantas *et al* (2006), Kérouaton *et al* (2007), Menegotto e Picoli (2008).

Nenhuma das cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas neste estudo, apresentaram fenótipo de resistência à metilicina, assim como, a presença do gene *mecA* não foi confirmada em nenhum dos isolados. A presença de MRSA em alimentos de origem animal é investigada em diversos estudos (VAN LOO *et al.*, 2007; BOER *et al.*, 2009; LOZANO *et al.*, 2009; FEBLER *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2010; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2010; WEESE *et al.*, 2010; ARGUDIN *et al.*, 2011; DE JONGE *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2011; AGERSO *et al.*, 2012; FEBLER *et al.*, 2012; FLUIT, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2012; CARFORA *et al.*, 2015; AVSAROGLU *et al.*, 2016) e, de acordo com Wang Xin *et al.* (2014) embora os mesmos comprovem que a prevalência de MRSA seja baixa em alimentos, sua ocorrência representa uma ameaça potencial para os consumidores e enfatiza a necessidade de um melhor controle das fontes de contaminação. A presença de cepas MRSA em bovinos tem sido uma

preocupação para saúde pública e o fato de não ter sido identificado esse grupo de bactérias no queijo colonial é um fato relevante.

No presente estudo, todas as cepas foram susceptíveis também a vancomicina, o que tem sido constatado também em outros estudos. Na Espanha, Agurdín *et al.* (2012) observaram que 100% (n = 64) dos *S. aureus* isolados de alimentos e manipuladores eram susceptíveis a vancomicina. A mesma observação foi relatada por Xu *et al.* (2014) em 78 *S. aureus* isolados a partir do leite, carne, vegetais e alimentos congelados na China. Em vários estudos conduzidos em diferentes partes do mundo, não foi observada resistência à vancomicina em cepas de *S. aureus* isolados de queijos (FERREIRA *et al.*, 2016; SPANU *et al.*, 2014; AREFI *et al.*, 2014; CAN & CELIK, 2012; BARTOLOMED *et al.*, 2009; ANDRE *et al.*, 2008; NORMANNO *et al.*, 2007) corroborando com nossa pesquisa.

A tipagem molecular de agentes patogênicos como *S. aureus* é importante por duas razões, a primeira é conhecer a micro-variação genética na cepa em nível de linhagem durante investigação de surto, útil para rastrear a origem e entender a transmissão do patógeno; a segunda é observar a macro-variação genética para estudos filogenéticos e populacionais (NARUKAMA *et al.*, 2009; O'HARA *et al.*, 2016). Na Etiópia, Tarekgne *et al.* (2016) analisaram 160 cepas de *S. aureus* isoladas do leite e produtos lácteos nos quais, observaram 25 *spa type* diferentes, sendo os mais comuns t314 (17), t458 (15) e t6218(8). Na Colômbia, Herreira; García-López; Santos (2016) ao investigarem 8 cepas MRSA isoladas de queijos, observaram que todos pertenciam ao ST8 e *spa type* 024. Gonzalez *et al.* (2017) ao investigarem o perfil clonal entre 7 MRSA isolados em queijos minas frescal, no Brasil, observaram que os isolados apresentavam três diferentes perfis no PFGE e, de acordo com MLST apresentaram 4 tipos de sequências (ST1, ST5, ST72 e ST4304). Quatro MRSA foram agrupados em três *spa type* diferentes (t127, t568 e t2703) e, os demais (3 MRSA) as sequências de repetições encontradas não estavam cadastradas no banco *spa type*.

No presente estudo foram encontrados 19 *spa type* distribuídos em 11 marcas de queijo colonial, demonstrando diversidade entre os isolados que pode ser associada a múltiplas fontes de contaminação, como ambiente e/ou manipuladores. Os genótipos t127 e t002 se destacam como predominantes presentes com 34,93% e 21,68% de frequência, respectivamente. Não houve associação entre a distribuição de *spa typing* e as variáveis pontos de coleta e marcas de queijos coloniais comercializadas. Os *spa type* mais frequentes entre cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina foram t002, t189 e t571,

não havendo um predomínio de um *spa type*. Entretanto, todas as quatro cepas de *S.aureus* pertencentes ao *spa type* t571 apresentaram o perfil de tetra-resistência (CIP-GEN-PEN-TET), representando a totalidade das cepas que apresentaram esse perfil. Embora estas quatro cepas de *S.aureus* t571 tenham sido isoladas de queijos de três marcas distintas (F,P,Q) amostrados no mercado (n=3) e feira. É possível que se trate de um clone presente na população e investigações adicionais são necessárias para elucidar essa possibilidade. Cepas de MSSA t571 são comuns entre linhagens ST398 associados a humanos que tem contato com animais produtores de alimentos, principalmente suínos e bovinos. Embora a colonização com ST 398 seja comum em trabalhadores rurais as infecções são raramente documentadas em humanos (DONKER *et al.*, 2009; LOUZANO *et al.*, 2011; MORITZ & SMITH, 2011; WARDYN *et al.* 2018) ou em bovinos (HASMAN *et al.*, 2010), este resultado pode levar a supor a presença de um clone multiresistente circulante na região de produção desses derivados de leite; no entanto, não é possível inferir a origem da contaminação nestes alimentos.

Quatro isolados de *S. aureus*, epidemiologicamente não relacionados e pertencentes a *spa type* distintos, foram selecionados para o sequenciamento do genoma total (*Whole genome sequencing* – WGS). Para tanto foi incluído uma cepa de todos os *spa type* mais frequentes (t127 e t002) e uma cepa de cada grupo *unknown*. Pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) realizada *in silico* foram observadas a presença dos seguintes tipos de sequência: ST133, nas cepas apresentando as seguintes sucessões de repetições 03-16-21-17-23-13-17-17-23-24 e 03-16-21-17-23-13-17-17-24, classificadas como *unknown*; ST5/t002 e ST1 em t127. A partir do sequenciamento do genoma total destes quatro isolados foi possível realizar pesquisas moleculares adicionais nas quais foi detectado além de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (*norA* – bomba de efluxo fluorquinolonas; *ant(6)-Ia*, *aph(3')* – aminoglicosídeos; *blaZ* - β -lactâmicos; *msr(A)*, *mph(C)* – macrolídeos) gene que codifica para enterotoxina clássica C (*sec*).

ST1 e ST5 foram anteriormente relacionados à intoxicação alimentar estafilocócica (FETSCH *et al.*, 2014). Na China, ST5 é prevalente entre cepas produtoras de enterotoxinas isoladas em diferentes alimentos, incluindo MRSA (CHANG ET AL. *et al.*, 2016). No presente estudo pode se observar a detecção de *sec* na cepa apresentando o genótipo ST5 além de fenótipo de resistência frente a penicilina e eritromicina. Segundo Weinert *et al.* (2012) tanto ST1 quanto ST5 derivam de um ancestral de origem humana, enquanto ST133 deriva de um ancestral de origem bovina.

MRSA ST1 e ST5 e ST72 foram isolados em hospitais no Brasil (SCHUENCK *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2016).

A exemplo de outros estudos que investigaram a qualidade microbiológica de queijos, o queijo colonial comercializado em Feiras Modelo e no Mercado Público de Porto Alegre, foi confirmado como possível veiculador de microrganismos causadores de DTA. Entre esses patógenos, chama atenção a frequência de isolamento de *L. monocytogenes* e, principalmente, de *S.aureus*. Esse fato deve servir de alerta às autoridades sanitárias. Contudo, a frequência de cepas carreadoras de genes de resistência à penicilina e ausência de cepas MRSA foi um aspecto positivo, pois a presença de genes de resistência em bactérias veiculadas por alimentos é uma preocupação atual. A baixa população de *L. monocytogenes*, bem como, genes codificadores de enterotoxinas clássicas em *S.aureus* e a manutenção da cadeia do frio, observada na maioria dos pontos de coleta, podem estar contribuindo para o baixo número de casos de DTA relacionados ao consumo de queijo colonial no município de Porto Alegre.

6 CONCLUSÕES

A análise microbiológica de queijos coloniais comercializados em Feiras modelo e Mercado Público de Porto Alegre evidenciou a ocorrência de violações da legislação vigente, indicando que esse alimento pode estar envolvido em casos de DTA. Entre os patógenos investigados, predominaram *S.aureus* e *L. monocytogenes*.

As cepas de *S.aureus* isoladas de queijo colonial caracterizaram-se por baixa frequência de genes codificadores de enterotoxinas clássicas, baixa frequência de resistência a antimicrobianos e de cepas carreadoras de genes de resistência à penicilina e ausência de cepas MRSA, indicando a baixa virulência e resistência das cepas provenientes de queijo colonial.

A caracterização molecular de cepas de *S.aureus* e *L. monocytogenes* demonstrou haver diversidade entre as cepas, o que pode ser indicativo de múltiplas fontes de contaminação do produto durante sua elaboração.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. *et al.* International spread of multidrug-resistant *Salmonella schwarzengrund* in food products. **Emerging Infectious Disease**, 13, 726-731, 2007.
- AARESTRUP, F.M.; JENSEN, L.B. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Veterinary Microbiology**, 89, 83-94, 2002.
- AARESTRUP, F.M.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* and *Streptococci* of animal origin, In: Aarestrup, F.M.(Ed.), **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**, ASM Press, Washington, DC, 187-212, 2006.
- AARESTRUP, F.M. *et al.* Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.2054-2059, 2001.
- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Característica e Benefícios nutricionais dos queijos. Disponível em: http://www.abiq.com.br/nutricao_7.asp. Acesso em: 12 jan 2018.
- ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, p.489-493, 2003.
- ADALETI, R. *et al.* Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. **Braz J Infect Dis** 14: 11-14, 2010.
- ADAMI, F. S.; DAL BOSCO, S. M.; ALTENHOFEN, G.; SOUZA, C. F. V.; OLIVEIRA, E.C. Avaliação da qualidade microbiológica de linguças e queijos. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 12, n. 1, p. 46-55, 2015.
- ADHIKARI, R.P. *et al.* Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. **Journal of Infectious Diseases Advance**. 206:915–23, 2012.
- AGIUS, P.; KREISWIRTH, B.; NAIDICH, S.; BENNETT K. Typing *Staphylococcus aureus* using the *spa* gene and novel distance measures. **IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform**. 4(4):693-704, 2007.
- AGUILAR, C.E.G. *et al.* Microbial quality of industrial and retail market grated parmesan cheese in the State of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v 46, n 12. p. 2257-2263, 2016.
- ALBA, P. *et al.* Livestock-Associated Methicillin Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Sequence Type(CC) 1 in European Farmed Animals: High Genetic Relatedness of Isolates from Italian Cattle Herds and Humans. **PLOS ONE**, august 31, 2015.

- ALIBAYOV, B.; ZDENKOVA, K.; SAKOROVA, H.; DEMNEROVA, K. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **J Microbiol Methods** 107: 197–204, 2014.
- ALMEIDA, M.S.; SANTOS, S.S.B.; MOTA, A.R.; SILVA, L.T.R.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 1(36): 21-32, 2016.
- ALVES, J.; NIGUMA, N, H.; OLIVEIRA, T, C. Detection of *Salmonella* spp. in eight complex food matrices using polymerase chain reaction assay. **J. Food Saf.** 35:453–457, 2015.
- AMORIM, A. L. B. C.; COUTO, E. P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n.4, p.364-7, 2014.
- AMORIM, D. M. R.; PERSON, O. C.; AMARAL, P. J. ; TANAKA, I. I. Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. *O Mundo da Saúde*, São Paulo, v.33, n.4, p. 401-405, ago. 2009.
- ANDERSEN, J. L. *et al.* Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 12: 1487-1547, 2015.
- ANDRADE, C. C. P.; MANDELLI, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Estudo de bactérias lácticas na produção de queijo serrano. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58, 2006, Florianópolis. **Reunião...** Florianópolis: [s.n.], 2006.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B. *et al.* Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *SmaI* digestion. **Food Control**.;19(2):200-7, 2008.
- ANTONELLO, L.; KUPKOVSKI, A.; BRAVO, G.C. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. **Revista Thema**, 09(01), 2012.
- ANVISA – **Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde**, Brasília, 2006.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- ARAÚJO, W. N. *et al.* Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 2(1):10.14, 2001.

ARCURI, E. F. *et al.* Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

AREFI, F.; MOHSENZADEH, M.; RAZMYAR, J. Isolation, antimicrobial susceptibility and *mecA* gene analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iranian white cheeses. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 15, n^o. 2, p. 127-131, 2014.

ARENAS, N.E. *et al.* Screening foodborne and zoonotic pathogens associated with livestock practices in the Sumapaz region, Cundinamarca, Colombia. **Trop. Anim. Health Prod.**, 49(4): 739-745, 2017.

ARGUDÍN, M. A.; ARIANE DEPLANO, A. *et al.* Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **PMC**, v. 6(2), 2017.

ARGUDÍN, M. A. *et al.* Genotypes, Exotoxin Gene Content, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains Recovered from Foods and Food Handlers. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2930–2935, 2012.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773; 2010.

ARGUDÍN, M.A. *et al.* Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. **Applied Environmental Microbiology**. 77, 3052-3060, 2011.

ARGUDÍN, M.A.; VANDERHAEGHEN, W.; BUTAYE, P. Diversity of antimicrobial resistance and virulence genes in methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci from veal calves. **Res. Vet. Sci.** 99, 10–16, 2015.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciênc. Agr.**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology & Infection**, v.130, p.33–40, 2003.

ASPRIDOU, Z.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C.G.; KOUTSOUMANIS, K.P. Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Research International**, 64, 683-694, 2014.

AVSAROGLU, M. D. Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from various foods of animal origin in Kirsehir, turkey and their enterotoxigenicity. **Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology**, 4 (12): 1179-1184, 2016.

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus*

strains isolated in the Marmara Region of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 99–106, 2011.

BABA, T. *et al.* Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic *Staphylococci*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 10, p. 1180-1190, 2009.

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

BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. **UEPG Biol. Health Sci.**, v.17, n.1, p. 47-51. 2011.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BARBUDDHE, S. B.; CHAUDHARI, S. P.; MALIK, S. V. S. The occurrence of pathogenic *Listeria monocytogenes* and antibodies against listeriolysin-O in buffaloes. **J. Vet. Med.**, v. 49, p. 181-184, 2002.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Ateneu, 1998.

BASSETI, D.; BERGH, K.; MISHALI, H.; ARBEIT R, D.; SPRATT, B.G. Regional infection control assessment of an antibiotic resistance knowledge and practice in *Staphylococcus aureus*. **Infect Control Hosp Epidemiol** 35:805-810, 2013.

BASTOS, C. P. **Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos**. 2013. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

BAZZI, A. M.; RABAAN, A. A.; FAWARAH, M. M.; AL-TAWFIQ, J. A. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* infections in a Saudi Arabian hospital. **Journal of Infection and Public Health**, v. 8, p. 364368, 2015.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Microbiology**, Washington, v. 38, n. 9, p. 3453-3456, 2000.

BECKER, K. *et al.* Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 304, n. 7, p. 794-804, 2014.

BELOTI, V. *et al.* Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade.p.181-186, 2015.

BEN SAID, M. *et al.* Genetic characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tunisia. **Letters in Applied Microbiology**, 63, p. 473- 481, 2016.

BERGDOLL, M. S.; WONG, A. C. L. Staphylococcal intoxications. *In*: RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Infections and Intoxications**. 3rd ed. Elsevier, 2006. p. 523-562.

BERNARDI, S.; GOLINELI, B. B.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Aspectos da aplicação de culturas starter na produção de embutidos cárneos fermentados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 133-140, abr./jun. 2010.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

BERTOLLONI, F. *et al.* Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine from bulk tank milk. **Dairy Sci and Technol.**, 95: 341-352, 2015.

BESSE, N. G.; AUDINET, N.; KEROUANTON, A.; COLIN, P.; KALMOKOFF, M. Evolution of *Listeria* populations in food samples under going enrichment culturing. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 104, n. 2, p. 123-134, 2005.

BHARGAVA, K. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. **Emerg Infect Dis.**;17:1135–1137, 2011.

BHILEGAONKAR, K. N.; KULSHRESTHA, S. B.; KAPOOR, K. N.; KUMAR, A.; AGARWAL, R. K.; SINGH, B. R. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milk. **J. Food. Sci. Technol.**, v. 34, p. 248-250, 1997.

BHUNIA, A. K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. Nova York. Springer. p.276, 2008.

BIANCHI, D.M.; GALLINA, S.; BELLIO, A.; CHIESA, F.; CIVERA, T.; DECASTELLI, L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. **Lett. Appl. Microbiol.**, 58, 190–196, 2014.

BLAHA, T. The use of antimicrobial substances in food animals: the pig picture. *In*: 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Clinical and Physical Hazards in Pigs and Pork, 2011, Maastricht, Anais, v.1, p.131-133, 2011.

BLAIOTTA, G. *et al.* Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 192-201, Jan. 2010.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. *In*: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

BORGES, M. D. F. *et al.* *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. (Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 119).

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C. de; MACHADO, T. F. Salmonelose Associada ao Consumo de Leite e Produtos Lácteos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; *et al.* *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados. **B. Ceppa**, v. 21, n. 1, p. 71-86, 2008.

BORUCKI, M. K.; CALL, D. R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5537-5540, 2003.

BOSILEVAC, J. M.; KOOHMARRAIE, M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. **Applied Environmental Microbiology**, v.77, p.2103-2112, 2011.

BOUBAKER, K. *et al.* Panton-Valentine leukocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 121-124, 2004.

BOYEN, F. *et al.* Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 187- 195, 2009.

BRAKSTAD, O. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1654-1660, 1992.

BRASIL. Manual de Procedimentos. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – **PREBAF**. ANVISA, 2004.

BRASIL. Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococcus e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – **PREBAF**. ANVISA, 2008.

BRASIL. Resolução-RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001, seção I, n. 7-E, p. 46-53.

BRASIL: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 6 jan. 2017.

BRASIL: Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos**. Brasília, DF, 1996. Disponível em: <http://www.dourados.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/05/RTIQ-Leite-Completo-PORTARIA-146_96-ok.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2017.

BRASIL: Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

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.

BRITO, J.R.F. *et al.* Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant To Establish Prevalence, Relatedness, and Sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, ago. 2008.

BUSSCHAERT, P.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F. Estimating distributions out of qualitative and (semi) quantitative microbiological contamination data for use in risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p.260-269, 2010.

BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:163-170, 2001.

BUBECK WARDENBURG, J. *et al.* Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. **Journal Infection Disease**. 198:1166-70, 2008.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.** 2003, 16, 175–188.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p. 1-8, jan. 2011.

CASARIL, K.B.P.B.; BENTO, C.B.P.; HENNING, K.; PEREIRA, M.; DIAS, V.A. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.7, n.2, p.75-85, jun. 2017.

CAMARGO, T. M. Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades

leiteiras do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CAN, H. Y.; ÇELIK, T. H. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish chesses. *Food Control*, 24:100-103, 2012.

CAPALONGA, R.; RAMOS, R. C.; BOTH, J. M. C.; SOEIRO, M. L. T.;

CARDOSO, H. F. T.; COSTA, G. M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.22, n.5, p.199-206, 2000.

CARFORA, V. *et al.* Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, 2015.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S; LINARDI, V.R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Chesse and raw milk in Brasil. *Food Microbiol*, 19, 914, 2002.

CASARIL, K. B. P. B. *et al.* Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. v.7, nº 2,p. 75-85, 2017.

CASTRO, A. C. S., PINTO JÚNIOR, W. R., TÁPIA, D. M. T. & CARDOSO, L. G. V. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo mussarela comercializados no ceasa de Vitória da Conquista – BA. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 23, 414, 2013.

CAUWERTS, K. Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. *Microbiology Drug Resistance*, v.12, n.4, p.284-288, 2006.

CAUWERTS, K.; DECOSTRE, A., DEGRAEF, E.M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. Hight prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n.5, p.395-399, 2007.

CAVALCANTI, S. M. M. *et al.* Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, **Brasil. Rev Bras Epidemiol** 9(4): 436-446, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>. Acesso em 10 julho de 2016

CENTIKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**, 13(4):686-707, 2000.

Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. In: Dados de Infecção Hospital Geral 2015. Acesso em: 03 fev 2017. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandreبرانjac/>

CERQUEIRA, A. M. F. *et al.* High occurrence of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro state, Brasil. **Vet. Microbiol.** 90 (1-2): 11-121, 1999.

CERQUEIRA, E. S.; ALMEIDA, R. C. C. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 268-281, out.-dez., 2013.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. *et al.* Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, London, v. 46, p. 222-226, Apr. 2015.

CHAMBEL, L. *et al.* Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International journal of food microbiology**, v. 116, n. 1, p. 52-63, 2007.

CHANG, C.J.; CHEN, N. C.; LAO, C. K.; HUANG, Y. C. Nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* carriage among janitors working in hospitals in northern Taiwan. **PLoS One** 10: 1–11, 2015.

CHANG, S. *et al.* Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **N Engl J Med.** 348:1342-7, 2003.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Cienc. Equat.**, v. 2, n. 1, p.114, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 26th ed. Wayne, 2016. (CLSI supplement M100-S).

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;** Twenty-Second Informational supplement, CLSI M100-S22, volume 32, no 3, 2012.

CODEX ALIMENTARIUM – CODEX – Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance (CAC/RCP 61 – 2005). Roma, 2005.

COHEN P. Cutaneous community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in participants of athletic activities. **South Med J.** :98(6)506-602, 2005.

- COSTA, G. M. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas
- COUTINHO, V. L. S. *et al.* Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. **Braz J Infect Dis** 14: 564-568, 2010.
- CRAWFORD, R.W. *et al.* Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. Gallbladder colonization and carriage. PNAS, v. 107, p. 4353-4358, 2010.
- CREMONESI, P. *et al.* Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.
- CROXEN, M.A. *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- CRUZ, C.D., MARTINEZ, M.D., DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* : um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alimentação e Nutrição Araraquara*. V.16, p.195-206, 2008.
- CUNY, C. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 109-117, 2010.
- D'AOUST, J. Y. *et al.* *Salmonella* eastbourne outbreak associated with chocolate. **J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.**, Ottawa, v. 8, n. 4, p. 181-184, 1975.
- DA SILVA, Á. S. *et al.* *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: uma revisão. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.
- DA SILVA, E. P.; DE MARTINIS, E. C. P. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 957-968, 2013.
- DANTAS, D. S. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 9, 110-118, 2013.
- DE BOER, E. *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal Food Microbiology**. 134:52-6, 2009.
- DE BUSSER, E. V.; ZUTTER, L.; DEWULF, J.; HOUF, K.; MAES, D. *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. *The Veterinary Journal*. London, v. 196, p. 2027, 2013.
- DE BUYSER, M. L. D.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2001

DE LEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. May 1;375(9725):1557-68, 2010.

DEMARCO, C. E. *et al.* Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocidas in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51:3235-3238, 2007.

DE NES, F.; RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, A.P.G.; d'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 4, jul./ago. 2010.

DENIS, O. *et al.* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. **Ermeging Infectious Diseases**. 15: 1098-1101, 2009.

DERRA, F. A. *et al.* Occurrence of *Listeria* spp. in retail meat and dairy products in the área of Addis Ababa, Ethiopia. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 10, p. 577579, 2013.

DIAS, N. L. Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.52f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2010.

DIAS, N. L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D. C B. S. *et al.* Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enteroxinas e de resistência à metilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n.1, p. 1547-1552, 2011.

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

DISSON, O.; LECUIT, M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 2012.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MC LANDSBOUROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.

DOIJAD, S. *et al.* Incidence and genetic variability of *Listeria* species from three milk processing plants. **Food Control**, v. 22, p. 1900-1904, 2011.

DOUMITH, M. *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004.

DOUMITH, M. *et al.* Pathogenomics of *Listeria* spp. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 297, p. 541-557, 2007.

DUERDEN, B. MRSA: why have we got it and can we do anything about it? **Eye (Lond)**, v. 26, p. 218-221, 2012.

DUODU, S. *et al.* Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. **Food Microbiology**, 27, 795-801, 2010.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), RICCI, A.; ALLENDE, A.; BOLTON, D. *et al.* Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **EFSA Journal**, 16(1):5134, 173 p. 2018.

EL BAYOMI, R. M. *et al.* Occurrence, Virulence Factors, Antimicrobial Resistance, and Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Chicken Products and Humans. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n° 3, 2016.

EL SEEDY, F. R.; SAMY, A. A.; SALAM, H. S. H.; KHAIRY, E. A.; KORANEY, A. A. Polymerase chain reaction detection of genes responsible for multiple antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin in Egypt. **Veterinary World**, v.10, October, 2017.

EL-JAKEE, J.K. *et al.* Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bovine and human sources in Egypt. *Glob. Vet.*, 7: 581-586, 2011.

ENRIGHT, M.C.; DAY, N.P.J.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, B.G. Multilocus Sequence Typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical and Microbiology**. 38, 1008–1015, 2000.

ENTORF, M.; FEBLER, A. T.; KASPAR, H.; KADLEC, K.; PETERS, T.;SCHWARZ, S. Tylosin susceptibility of staphylococci from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 171, p. 368-371, 2014.

EVANGELISTA, S.S.; OLIVEIRA, A.C. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**. 68(1):136-43, 2015.

FALLAH, A. A. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. **Food Control**, 28: p. 327-332, 2012.

FARBER, J. M., GENDEL, S. M., TYLER, K. D., BOERLIN, P., LANDRY, W. L., FRITSCHER, S. J., BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. *In*: DOWNES, F. P., ITO, H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), Cap. 11, p.127-158, 2001.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; *et al.* Review of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal Food Microbiology**. mar. 15, 162(2): 190-212, 2013.

- FAVA, L. W., HERNANDES, J.F.M., PINTO, A.T., SCHMIDT, V. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**. 40(4): 1084. 2012.
- FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal Antimicrobial Chemother**. 65, 619-625, 2010b.
- FEBLER, A.T. *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. **Veterinary Microbiology**. 160, 77-84, 2012.
- FEBLER, A.T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococci* from bovine mastitis. **Journal Antimicrobial Chemother**. 65, 1576-1582, 2010a.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: **Chapter 4A, Bacteriological Analytical Manual on line**. Food and Drug Administration – FDA/CFSAN, 2011.
- FERENS, W. A. *et al.* Induction of type 2 cytokines by a staphylococcal enterotoxin superantigen. **Journal of Natural Toxins**, v. 7, n. 3, p. 193-213, 1998.
- FERNANDEZ, V. N. V.; ZANELA, M. B. Tipos de produtos lácteos consumidos na cidade de Porto Alegre/RS e possibilidades à agroindústria de base ecológica. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Curitiba, v. 4, n. 2, nov. 2009.
- FERREIRA, A.W. *et al.* Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. **Rev Patol Trop** 2009; 38:83-92.
- FERREIRA, M. A. *et al.* Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **J. Dairy Sci**. 99:1-9, 2016.
- FERREIRA, V. *et al.* Diverse gene and phenotypes of resistant *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage productions facilities in Portugal. **Appl. Environ. Microbiol**. 77, p. 2701-2715, 2011.
- FESSLER, A.T. *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. **Appl Environ Microbiol**.;77:7151-7157, 2011.
- FIJALKOWSKI, K.; PEITLER, D.; KARAKULSKA, J. *Staphylococci* isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 238, n. 5, p. 113-120, 2016.
- FITZGERALD, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends Microbiology**. 20, 192-198, 2012.

FLUIT, A.C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18, 735-744, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Food Code 2009: Annex 3 - Public health reasons/ Administrative Guidelines. Silver Spring: Department of Health and Human Services, Public Health Service, U. S. Food and Drug Administration, 2009.p. 315-49.

FORSYTHE, S. J. Ferramentas de gestão da segurança de alimentos. In: FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 8, p. 375-389.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 2000. 544 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 184p.

FUEYO, J. M. *et al.* Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen genes profile *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. **J. Clin. Microb.**, 43: 1278-1284, 2005.

FUKUDA, H. *et al.* Contributions of the 8-methoxy groups of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemother**, 45: 1649-1653, 2001.

GALVANI, J. W. C.; AZEVEDO, D. L. Avaliação das características de queijos tipo colônia produzidos em estabelecimentos com inspeção estadual no Rio Grande do Sul.

GANDRA, E. A. *et al.* Standardization of multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. **Food Sci Technol**; 31:946–9, 2011.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum. Technology*, vol. 30, núm. 1, 2008, pp. 109-118 Universidade Estadual de Maringá Maringá, Brasil.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; et al. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **Veterinary Journal**.192:550–2, 2012.

GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M.T.G.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 595–603, 2011.

GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUNEZ M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 551-555, 1998.

GELATTI, L. C. *et al.* Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 458-60, 2009.

GELATTI, L.C.; BECKER, A.P.; BONAMIGO, R.R.; D'AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Porto Alegre, v. 84, n. 5, p. 501-506, fev. 2009.

GENESTIER A.L. *et al.* *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3117-3727, 2005.

GIGUÉRE, S. Macrolídeos, Azalídeos e Cetolídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

GILLET, Y. *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, 9: 359-753, 2002.

GODOY, I. *et al.* Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. from domestic and wild animals. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 12, p. 2148-2151, dez. 2016.

GÓMEZ-SANZ, E. *et al.* First *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* containing a *mecB*-carrying gene complex independent of transposon Tn6045 in a *Micrococcus caseolyticus* isolated from canine infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 8, p. 4577-4583, 2015.

GONZALES, A. G. M. Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no estado do Rio de Janeiro. 2003. 199p.

GONZALES-ESCOBEDO, G.; MARSHALL, J. M.; GUNN, J. S. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: Understanding the carrier state. *Progress*, v. 9, p. 9-14, 2010.

GONZALEZ, A. G. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. **FEMS Microbiology Letters**, v.364, nº 23, 2017.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 5, p. 734-740, 2008.

GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUJIKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medicine and Microbiology**. 301, 630-634, 2011.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae Of The Salmonella Serovars: World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. 9 ed. Paris: Institut Pasteur, 2007.

GRKOVIC, S., M. H. BROWN, AND R. A. SKURRAY. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:671-701, 2002.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M.E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology.** 98:23–27, 2004.

GUIMARRÃES, F. D. I. *et al.* Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science,** 96: 2866-2872, 2013.

GUSSO, A. P. Salga de queijos – Uma revisão. In ANAIS DO I ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, Toledo, 2009. Disponível em: http://www.utfpr.edu.br/toledo/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/anais-do-endict-encontro-de-divulgacao-cientifica-e-tecnologica/anais-i-endict/Ana%20Gusso%20_Queijo%20p.70-74_.pdf . Acesso em: 27 de outubro de 2015.

GUTH, B, E, C.; *et al.* *Escherichia coli* situation in Brazil Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America, Chapter 11, p. 161-178, 2010.

HAGIHARA, M. *et al.* Daptomicin approved in Japan for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Ther. Clin. Risk. Manag.** 8: 79-86, 2012.

HAMMAD AM, WATANABE W, FUJII T, SHIMAMOTO T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Int J Food Microbiol.**;156:286–289, 2012.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S.A.; ROUSSEAU, J.; LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; HARAN, K. P.; GODDEN, S. M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J. B.; SREEVATSAN, S. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **J. Clin. Microbiol.** 50:688–695, 2012.

HARMSSEN, D.; CLAUS,H.; WITTE,W.; ROTHGANGER,J.; CLAUS,H.; TURNWALD,D.; VOGEL,U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. **Journal Clinical Microbiology.** 41, 5442–5448, 2003.

HARRISON, E. M. *et al.* A *Staphylococcus xylosus* isolated with a new *mecC* allotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** Washington, v. 57, n. 3, p. 1524-1528, 2013.

HARTMAN, B.J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with b-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, 1984; 158: 513–6.

HASMAN, H.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M. *Spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. **Veterinary Microbiology**, 141, 326-331, 2010.

HATKAR, S.; BANSAL, V.; MARIYA, S.; GHOGARE, H. Antimicrobial Profile of Inducible Clindamycin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples. **Int J Health Sci Res** 4(6): 99-103, 2014.

HAUSCHILD, T. *et al.* Target gene mutations among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin susceptible *S. aureus* with elevated MICs of enrofloxacin obtained from diseased food-producing animals or food of animal origin. **J Antimicrob Chemother**, 67: 1791–1809, 2012.

HAVERI, M. *et al.* Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary Microbiology** 106, 97–102, 2005.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L., DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.815–836, 2012.

HENNEKINNE, J.A.; KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. **Journal Applied Microbiology** 94: 321–329, 2003.

HERRERA, F. C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; SANTOS, J. A. Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia. **J. Dairy Sci.** 99 :7872–7876, 2016.

HIRAMATSU, K. *et al.* Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy**. 45(2): 117-136, 2013.

HITCHINS, S. *et al.* Critical steps in detection of *Listeria monocytogenes* using the FDA BAM culture methodology. **Lecture in the 5th Annual Food Pathogen Analyses Conference** St. Pete. Beach, Florida, 29th, 2002.

HO, J. *et al.* Tracking sources of *Staphylococcus aureus* hand contamination in food handlers by spa typing. **American Journal of Infection Control**, 43: 759-461, 2015.

HOELZER, K.; POUILLOT, R. Practical considerations for the interpretation of microbial testing results based on small numbers of samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 11, p. 907-915, Nov. 2013.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (Eds.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. Cap.5: Facultative anaerobic Gram-negative rods: p. 175-189.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 32-37, jan./fev. 2006.

HOSOSAKA, Y.; HANAKI, H.; ENDO, H.; SUZUKI, Y.; NAGASAWA, Z.; OTSUKA, Y.; et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal Infection Chemotherapy**. 13, 79-86, 2007.

HUANG, J. *et al.* Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:909-917, 2004.
In: Congresso Nacional sobre Defesa Agropecuária, iv, 2013, Belém. **Resumos** Belém: Departamento de Defesa Agropecuária, Pará, 2013.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 302–310, Sept. 2008.

ISHIHARA, K. *et al.* Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. **Applied Environmental Microbiology**. v. 76, n.15, p. 5165–5174. 2010.

ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detectin method. Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland, 2004.

ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland, 1999.

ISO 6785: 2001. Milk and milk products – Detection of *Salmonella* spp. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland, 2001.

ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detectin method. Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland, 2004.

JAMALI, H., RADMEHR, B., THONG, K. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*, v.34. p.121-125, 2013.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.

JARRAUD, S. *et al.* Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth agr Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 22, p. 6517–6522, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 711p. 2005.

JENSEN, S.O.; LYON, B.R. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, 4, 565-582, 2009.

JEVONS, M.P. ‘Celbenin’-resistant staphylococci. *British Medical Journal*, 1: 124–5, 1961.

JOHLER, S. *et.al.* Further Evidence for *Staphylococcal* Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**.7 (2015) 997-1004.

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

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGASEN, H. R.; ROVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p. 158 – 167, 2005.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E. *et al.* MRSA transmission between cows and humans. **Emerg. Infect. Dis.** 13:630–632, 2007.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **Biomed Research International**, New York, v. 2014, Article ID n. 827965, 9 p., Apr. 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/827965/>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; STEINACKER, U.; KASPAR, H.; MANKERTZ, J.; SCHWARZ, S. Diversity antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 64, 1156-1164, 2009.

KADLEC, K.; *et al.* Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 65, 1826-1828, 2010.

KADLEC, K.; FEBLER, A.T.; HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Infection**. 18-745-755, 2012.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**. 23, 276-282, 2012.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrk*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strains and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 53, 776-778, 2009.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm(T)*, *dfrk* and *tet(L)* in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.54, 915-918, 2010.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification of the novel *dfrk*-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.54,3475-3477, 2010b.

KALMUS, P.; AASMAE, B.; KÄRSSIN, A. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Vet Scand**. 2011;53(4):1-7.

KALOREY, D. R. *et al.* Listeria species in bovine raw milk: a large survey of central India. **Food Control**, v. 19, p. 109-112, 2008.

KARTHIKEYAN, R.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Molecular Serotyping and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk and Milk Products in Tamil Nadu, India. **Foodborne Pathog. Dis.**,v. 12, n. 6, p. 522-528, 2015.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 44: 1549–55, 2000.

KEROUANTON A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT L.; CHESNEAU O.; KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C. AND WEESE, J.S. (2008)

KLANČNIK, A., TOPLAK, N., KOVAČ, M., JERŠEK H. M. B. Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. v. 118, p. 37–41. 2015.

KLUYTMANS, J. A. Methicilin-resistant staphylococcus aureus in food products: cause for concern or case for complacency? **Clin. Microbiol. Infect**. 16: 11-15, 2010.

KOMATSU, S. L. *et al.* Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijos Minas frescal produzido em Uberlândia, MG. **Bioscience Journal**. V. 26, nº 2, p. 316-321, 2010.

KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. Sexta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteraceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: APHA (American Public Health Association) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

KOT, B.; SZWEDA, P.; FRANKOWSKA-MACIEJEWSKA, A.; PIECHOTA, M.; WOLSKA, K. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research**, v.83, n.2, p. 228-235, 2016.

KOTHARY, M. H.; BABU, U. S. Infective Dose of Foodborne Pathogens in Volunteers: A Review. **Journal of Food Safety**, Washington, v. 21, p. 49-73, 2001.

KREASUKON, K. *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal of Dairy Science** v. 95, n. 8, 2012.

KRISHNA, S.; MILLER, L.S. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. **Curr Opin Microbiol.** 15:28–35, 2012.

KROPEC, A. *et al.* Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6868–6876, 2005.

KÜREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science** Vol. 99 No. 4, 2016.

KURODA, M., OHTA, T., UCHIYAMA, I, BABA, T., YUZAWA, H., *et al.* Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.357, p.1225–1240, 2001.

LAMAIA H. C.; CERQUEIRA M. M. O. P.; CARMO L. S. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LAMONT, R. F. *et al.* Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of perinatal medicine**, v. 39, n. 3, p. 227-236, 2011.

LANGER, A. J. *et al.* Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws – United States, 1993-2006. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 3, p. 385-390, Mar. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377202>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

LANGONI, H.; FONSECA, P. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina, importância para a saúde pública. **Hig. Aliment.**, v. 2, n. 50, p. 36-38, 1997.

LAPONGOV, I. *et al.* Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. **Nat Struct Mol Biol** 2009; 16 (6): 667-9.

LARSEN, M.V. *et al.* Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. **J. Clin. Microbiol.** 2012. 50(4): 1355-1361

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

LECLERCQ, A. *et al.* *Listeria rocourtiae* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, n. 9, p. 2210-2214, 2010.

LEE, C.R.; CHO, I. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n. 9, p. 4274–4305, 2013.

LEE, J. H. *et al.* Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microb.*, v.69, p.6489-6494, 2003.

LEITE JÚNIOR, B. R. de C.; OLIVEIRA, P. M. ; SILVA, F. J. M.; MARTINS, M. L. Qualidade microbiológica de alimentos de origem animal comercializados na região de Minas Gerais. *VÉRTICES*, Campos dos Goytacazes/ RJ, v.15, n. 2, p. 49-59, maio/ago. 2013.

LUCAS, S. D. M.; SALCO, A.; FELDHAUS, S.; DRUNKLER, D. A.; COLLA, E. Padrão de identidade e qualidade de queijos colonial e prato, comercializados na cidade de Medianeira - PR. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Minas Gerais, v. 67, n. 386, mai/jun. 2012.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10:S122–S129, 2004.

LI, M. *et al.* MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nature Medicine*. 18(5):816-819, 2012.

LIM, S.K. *et al.* Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *Journal Microbiology Biotechnology*. 20, 775–778, 2010.

LIMA, G. C. *et al.* Assessing the epidemiological data of *Staphylococcus aureus* food poisoning occurred in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 759-763, Dec. 2013.

LINA, G. *et al.* Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 189, n. 12, p. 2334-2336, 2004.

LINA, G. *et al.* Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29: 1128-1132, 1999.

LINKE K. *et al.* Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5583-5592, 2014.

LOEFFLER, A.; LLOYD, D.H. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiology Infection*. 138, 595-605, 2010.

LOMONACO, S.; NUCERA D.; FILIPELLO V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infection Genetics and Evolution**, 35, 172-183, 2015.

LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; TONDO, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. *Journal Infect. Dev. Ctries.*, v. 8, p. 811-817, 2014.

LOPES, H.V. CA-MRSA: Um novo problema para infectologia. *Revista Panamericana de Infectologia*. 7(3), 34-36, 2005.

LOWDER, B. V. *et al.* Recent human-to-poultry host jump, adaptation and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. **Plasmids**, 49, 93-105, 2009.

L-SUNG, J. M.; LLOYD, D. H.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Journal of Microbiology**, v. 154, n.7, p. 1949-1959, 2008.

LUINI, M. *et al.* Meticilin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra- mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. **Veterinary Microbiology**. 178, p. 270-274, 2015.

LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*. Genetics basis. **Microbiology Review**. 51, 88-134, 1987.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1128p., 2010.

MAIJALA, R.; LVYTIKAINEM, O.; JOHANSSON, T. *et al.* Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, 1-2, p.97-109, 2001.

MAJHI, S.; DASH, M.; MOHAPATRA, D.; MOHAPATRA, A.; CHAYANI, N. Detection of inducible and constitutive clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital, Eastern India. **Avicenna J Med** 6: 75-80, 2016.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLIGAN, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**, 2^aed. Mosby Elsevier, 2013.

MARQUES, S.C. Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Lavras. Dissertação de mestrado. Mestrado em Ciência dos Alimentos, 2005.

MARTINI, C. L.; LANGE, C.C.; BRITO, M. A. V. P.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; VAZ, E. K. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research** (2017) 84 202–205.

MARTINS, I. M. *et al.* Occurrence and characterization of enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* isolated from dairy products. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 34, n. 3, p. 185-192, Aug. 2014.

MARURI, F. *et al.* A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. **J Antimicrob Chemother**, 67 (4): 819-31, 2012.

MAYER, S., M. BOOS, A. BEYER, A. C. FLUIT, AND F. J. SCHMITZ. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.** 47:893–905, 2001.

MCCORMICK, J. K., YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 77-104, 2001.

MCDUGAL, L.K. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. **J Clin Microbiol.**41(11):5113-20, 2003.

MCGEER, A.; WEESE, J.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MCLAUCHLIN, J. *et al.* *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International journal of food microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

MCLAUCHLIN, J., MITCHELL, R. T., SMERDON, W. J., & JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p. 15–33, 2004.

MEDIAVILLA, J.R., CHEN, L., MATHEMA, B., KREISWIRTHET, B.N. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Current Opinion Microbiology**,15:588-95, 2012.

MEJIA, C.; ZURITA, J.; BLANCO, M. G. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin América. *The Brazilian journal of infectious diseases*, v 14, p.79-86, 2010.

MEJLHOLM O.; DALGAARD P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise based seafood salads. **Food Microbiology**, 46, 1-14, 2015.

MELAKE, N.A.; ZAKARIA, A.S.; IBRAHIM, N.H.; SALAMA, M.A., MAHMOUD, A.Z. Prevalence of Agr Specificity Groups among in vitro Biofilm Forming Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers. *International Journal of Microbiological Research*, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2014.

MELLMANN, A. *et al.* Sequencing and *Staphylococci* Identification. **Emerg. Infect. Dis.** v. 12, n. 2, p.333-336, 2006.

MELLO, J. F. *et al.* Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 1031-1037, Oct. 2014.

MELO, F. D. *et al.* Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41: 1152. 2013.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. V. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 147–150, 2007.

MENESES, R. B. *et al.* O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 25, n. 3, p. 381-392, Junho 2012.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surto de gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 639-645, out/dez. 2012.

MESQUITA, M.O.D. *et al.* Qualidade microbiológica no processo de frango assado em unidade de alimentação – nutrição. *Ciência e Tecnologia da Alimentação*, v.26, p. 198-203, 2006.

MIMICA, M. J. *et al.* Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 11, p. 415- 417, 2007.

MITTELSTAED, S.; CARVALHO, V. M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n. 3, p. 175-182, 2006.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A. Tecnologia de produção de derivados do leite. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

MOHAMMADI, S. *et al.* Emergence of SCCmec type III with variable antimicrobial resistance profiles and spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthcare- and community-acquired infections in the west of Iran. **International Journal of Infectious Diseases**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 152–158, fev. 2014.

MOHAMMED, M. A. *et al.* Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. *Food Control*. V. 25, p. 159-164, 2014.

MOISE-BRODER, P. A. *et al.* Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p. 1700–1705, 2004.

MONECKE, S. *et al.* A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**. 6(4):1793-6, 2011.

MONECKE, S. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus aureus* from diseased poultry. **Veterinary Microbiology**. 162, 806-812, 2013.

MOROSINI, M.I. *et al.* Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50: e2695-e2699, 2006.

MORRIS, D. O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary Dermatology**. 17:332–337, 2006.

MOUSSA, I. M. *et al.* Using molecular techniques for rapid detection of Salmonella serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh, Saudi Arabia. **Afr. J. Biotechnol.** 9:612–619, 2010.

MULDERS, M.N. *et al.* Prevalence of livestock-associated MRSA in broilerflocks and risk factors for slaughterhouse personnel in the Netherlands. **Epidemiology and Infection**, 138, 743–755, 2010.

MÜLLER, A. *et al.* Variety of Antimicrobial Resistances and Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Isolates from Meat Products Legally and Illegally Introduced to Germany. **PLOS ONE** | DOI:10.1371/journal.pone.0167864 December 9, 2016.

MURAKAMI, K. *et al.* Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 29: 2240-2244, 1991.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALER, M. A. **Medical Microbiology**, 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016. 805 p.

NADER, A. F.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, A. Produção de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.59, n. 5, p.1316-1318, 2007.

NAGARAJ, S.; RAMLAL, S.; SRIPATHY, M.H.; BATRA, H.V. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p.435-446, 2014.

NAJERA-SANCHES, G. *et al.* Development of two multiplex PCR for the detection of enterotoxigenic strains of *S. aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1055 -1062, 2003.

NAKONIECZNA, J. *et al.* Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not

directly influence the response to photodynamic treatment. **BMC Microbiology**. 10: p. 323, 2010.

NECIDOVA, L. *et al.* Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n.11, p. 8638–8643, 2016.

NEMATI, M. *et al.* Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, v.52, p.3817–3819, 2008.

NERO, L. A. *et al.* Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 3, p. 211-215, 2004.

NYARKO, E.B.; DONNELLY, C.W.F. *Listeria monocytogenes*: Strain Heterogeneity, Methods, and Challenges of Subtyping. **Journal of Food Science**, v. 80, n.12, p. 2868-2878, dez. 2015.

NICAOGAIN K.; O'BYRNE, C. P. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain. **Frontiers in Microbiology**, 7, 2016.

NIENHOFF, U. *et al.* Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 64, 660-662, 2009.

NIGHTINGALE, K.K., WINDHAM, K., MARTIN, K.E., YEUNG, M., WIEDMANN, M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied Environment Microbiology**, v. 71, p. 8764– 8772, 2005.

NITISS J L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nat Rev Cancer** 2009; 9 (5): 327-37.

NORMANNO, G. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 2, p. 219-222, 2007.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands

NUNES, R. S. C. *et al.* Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 2641-2653, 2016.

O'HARA, P. F. *et al.* spa Typing and Multilocus Sequencing Typing Show Comparable Performance in Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States. **Microb Drug Resist** 22, 88-96, 2016.

- O'MAHONY, R. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Vet. Microbiol.** 109,285–296, 2005.
- OLANARIN, A. O.; NAICKER, K.; PILLAY, P. Toxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholera*: classification, pathogenesis and virulence determinants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.4, p. 94-100, 2011.
- OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C., TONIAL, I. B. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.2, p.521-523, 2012.
- OLIVEIRA, D.C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec-element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**. 46, 2155–2161, 2002.
- OLIVEIRA, M. M. M. DE, BRUGNERA, D. F., ALVES, E., & PICCOLI, R. H., Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 97-106, 2010.
- OLIVEIRA, T. C. R. M.; CUNHA, M. L. R. S.; HIROOKA, E. Y. Enterotoxinas estafilocócicas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 16, n.1, p.178-187, mar. 1995.
- OLIVER, S. P.; BOOR, K. J.; MURPHY, S.C.; MURINDA, S. E. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathog. Dis.** 6:793–806, 2009.
- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 115–129, jun. 2005.
- OLSEN, J.E.; CRHISTENSEN, H.; AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 57, 450-460, 2006.
- OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDING, J. S. *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreak – United States, 1993 – 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, n SS01, p. 1-51, 2000.
- OMOE, K. *et al.* Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxin. **Infect. Immun.** 71, 6088-6094, 2013.
- ORLOVIC, J.; MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; DINIC, M.; RISTIC, L. Resistance in *Staphylococcus aureus*: the never-ending story. **Acta Facultatis Medicinae Naissensis**, 33 (3): 153-162, 2016.
- ORSI, E.H., BAKKER, H.C., WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics. **International Journal of Medicine Microbiology**. v.301, p.79-96. 2011.

ORSI, R.H.; WIEDMANN M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100, 5273 -5287, 2016.

ORTEGA, E. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. **Toxins**: 2(8): 2117–2131, 2010.

OSAILI, T. M.; ALOBOVDI, A. R.; NESIAR, E.A. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. **Food Control**, 22, 586-590, 2011.

OSTYN, A. *et al.* First evidence of a food-poisoning due to staphylococcal enterotoxin type E in France. **Euro surveillance**. 15: 19528, 2010.

OTTO, M. - *Staphylococcus aureus* toxins. **Curr Opin Microbiol**. 1(2015) 32-37.

OVERESCH, G.; BÜTTNER, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST49 in slaughter pigs in Switzerland. **BMC Veterinary Res**. 7, 30, 2011.

OYAMADA, Y. *et al.* Gene cloning and characterization of *SdrM*, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from *Staphylococcus aureus*. **Biol. Pharm. Bull**. 29:554-556, 2006.

PADILHA, M. R. F. *et al.* Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 161-171, 2001.

PAJIĆ, M. J. *et al.* The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 3, p. 205-214, 2014.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Front. Microbiology**. 3, 127, 2012.

PARK, J. Y. *et al.* Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-2, p. 149-154, 2011.

PARRETEN, V. *et al.* Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 65, 1145-1154, 2010.

PARRILO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1427, 1993.

PARRY, C. M.; HIEN, T. T.; DOUGAN, G.; WHITE, N. J.; FARRAR, J. J. Typhoid Fever. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v. 347, p. 1770-1782, 2002.

PAULIN, S.; HORN, B.; HUDSON, J. A. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products. **Manual Prepared for the Ministry for Primary Industries**. 83 p. 2012.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 84, n. 1, p. 577-601, June 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26034890>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

PEACOCK, S.J. *et al.* Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 4987–4996, 2002.

PEREIRA, V. *et al.* Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 26(2009) 278-282.

PERESI, J. T. M. *et al.* Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n. 83, p.6370, 2001.

PEREZ-LOZADA, M., PORTE M.L., VISCIDI, R.P., CRANDALL, K.A. Multilocus Sequence Typing of Pathogens. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**.503-521, 2011.

PÉREZ-TRALLERO, E. *et al.* Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, n. 12, p. 2155, 2014.

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

PERUGINI, M.R.E. *et al.* Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 36, n. 1, supl, p. 275-282, 2015.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:382-397, 2006.

PIETROWSKI, G. A. M.; RANTHUM, M.; CROZETA, T.; JONGE, V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo Mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.2, n.2, p.25-31. 2008.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, Feb. 2009.

- PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.78, n.2, p.191-198, abr./jun., 2011.
- PINTO, M. S. *et al.* Segurança alimentar do queijo Minas Artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas praticas de fabricação. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 342-347, out./dez. 2009.
- PINTO, P. S. A. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.14, p. 39-43, 2000.
- PIRES, S. M., *et al.* Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 3, p. 129-138, Jan 2011.
- PRADHAN A. K. *et al.* Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli meats at retail. **Journal of Food Protection**, 74, 1860-1868, 2011.
- PRAJAPATI, B. S.; PRAJAPATI, R. B. Toxic shock syndromes. **Pediatric Infectious Disease**, v. 2, n. 1, p. 10-13, 2010.
- PRICE, L.B. *et al.* *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **mBio**, v.3, e00305-11, 2012.
- PU, S.; HAN, F.; GE, B. Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Louisiana Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 265– 267, 2009.
- PULSENET. The national Molecular Subtyping network for foodborne disease surveillance – **Standardized Laboratory protocol for molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)**. 2009.
- PUTMAN, M., H. W. V. VEEN.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:672-688, 2000.
- PYÖRALA, S.; TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 3–8, 2009.
- QUINN, J. P. *et al.* **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2nd ed. Wiley, 2011. 400 p.
- QUINN, P. J.; MARKE, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Listerias. *In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 193-199.
- RAHIMI F, KATOULI M, KARIMI S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microbiol Pathog* 98: 69-76, 2016.

- RAHIMI, E.; AMERI, M.; MOMTAZ, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. **Food Control**, v. 21, p. 1448-1452, 2010.
- RALL, V. L. M. *et al.* Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **J. Dairy Sci.**, 97: 829-837, 2014.
- RALL, V. L. M. *et al.* Polymerase chain reaction detection of enterotoxinas genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 9, p. 1121-1123, Sept. 2010.
- RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**. 13, 151-171, 2010.
- RASIGADE JP, VANDENESCH F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infect Genet Evol* 21: 510–514, 2014.
- RIBEIRO, I.F. *et al.* Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em estudantes universitários. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**. 35(2):301-304, 2014.
- RIBEIRO, J. C. B. *et al.* Qualidade físico-química e microbiológica do queijo parmesão ralado comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 67, 21-29, 2012.
- RIBEIRO, L. F. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in cheese production chain made from raw milk, Jaboticabal, SP, v.31, n.2, p.49, 2015.
- RICH, M.; ROBERTS, L.; KEARNS, A.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. **Vet. Microbiol.** 105, 313–314, 2005.
- RICHTER, A. *et al.* Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. **Epidemiology Infection**. 140:2223–32, 2012.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio. **Normas Técnicas de Instalações e Equipamentos para Fábricas de Laticínios**. Porto Alegre, 2006. Disponível em: <http://www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/12675561821178624231Fabrica_de_Laticinios.pdf>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2016.
- RIVERA-TAPIA, J.A. Antibiotic resistance public health problem. **Anal Med Associaç Med Amer Brit Cowdray Hosp**. 48(1):42-47, 2003.
- ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SCHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v.35, n 3, p.263-267, abr. 2003.

RODRIGUES, J.; FIDELIS DE FARIAS, H. L.; BARBOSA, F.F.; GARCIA, T.A.; ISSY, P.N.; ARMONDES, M.P.O. Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo minas frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-Go. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 3, p. 30-34, 2011.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. *et al.* Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. **Int. J. Food Microbiol.** 33, p. 209-229, 2015.

ROLA, J. A.; CZUBKOWSKA, A.; KORPYSA-DZIRBA, W.; OSEK, J. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. **Toxins**, 8, 62, 2016.

ROSA, J. L.; BARROS, R. F.; SANTOS, M. O. Características de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, nº2, 2016.

ROSENGREN, A. *et al.* Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 2, p. 263-269, Dec. 2010.

ROWLAND, S.J.; DYKE, K.G. Characterization of the Staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. **EMBO Journal**. 8, 2761-2773, 1989.

RUARO, A. *et al.* Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiology**, London, v. 34, n. 1, p. 106-111, May 2013.

RUDKIN, J.K. *et al.* Methicillin resistance reduces the virulence of health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. **Journal Infection Disease**. 205:798-806, 2012.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis, and food safety**. CRC Press, 2007.

SADER, H.S.; FRITSCHKE, T.R.; JONES, R.N. Antimicrobial activities of ceftaroline and ME1036 tested against clinical strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.52(3):1153-5, 2008.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; SCHOLL, D. T.; DEVRIES, T. J.; BARKEMA, H. W. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, nº. 4, 2012.

SAKAI, Y. *et al.* Successful infection control for a vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service centre. **J Hosp Infect** 92(4): 385-391, 2016.

SAKWINSKA, O. *et al.* Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis-Related *Staphylococcus aureus* Strains, Determined by Comparing

Swiss and French Isolates from the Rhône Valley. **Applied and Environmental Microbiology**, May 2011, p. 3428–3432, v. 77, n°. 10.

SAKWINSKA, O., GIDDEY, M., MOREILLON, M., MORISSET, D.; WALDVOGEL, A., MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* host range and human–bovine host shift. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5908–5915, 2011.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticaba, SP, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, p. 171-175, 2006.

SANAA, M.; COROLLER, L.; CERF, O. Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. *Risk Anal.*, v. 24, p. 389-399, 2004.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivo Instituto de Biologia**, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, A. *et.al.* - *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 43(2007) 413-423.

SANTOS, M. *et al.* Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais no município de Guarapuava e região. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste, **Resumo Salão de Extensão e Cultura**, 2008.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Avaliação das boas práticas de fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 67, 222-228, 2010.

SASIDHARAN, S.; PREMA, B.; YOGA LATHA, L. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Asian Pacific, **Journal of Tropical Biomedicine** (2011)130-132.

SATO, T.; USUI, M.; KONISHI, N.; KAI, A.; MATSUI, H.; HANAKI, H.; TAMURA, Y.; Closely related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat, cows with mastitis, and humans in Japan. **PLOS ONE** | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187319> October 30, 2017.

SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**. 134, 73-81, 2009.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2011.

SCAZZOCCHIO, F.; AQUILANTI, L.; TABACCHINI, C.; IEBBA V.; PASSARIELLO, C. Microbiological and molecular characterization of nosocomial and

community *Staphylococcus aureus* isolates. **Epidemiology Infection**. 139:613–22, 2011.

SCHELIN, J. *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**. 2(2011) 580-592.

SCHLEIFER, K-H., BELL, J. A. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. In: DE VOS, P. *et al.* (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2th ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. v. 3, 1445 p.

SCHOBITZ, R.; CIAMPI, L.; NAHUELQUIN, Y. *Listeria monocytogenes* Um peligro latente para la indústria alimentaria. *Agro Sur*. pg 1-8. 2009.

SCHUH, J.; MATTIELLO, C.A.; NETO, A.T.; MILEZI, M.J.; FERENZ, M.; RIBEIROS, M.; SILVEIRA, S.M. Avaliação dos parâmetros de pH e umidade e contaminação de queijos colonial por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. In: XXV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Gramado, 2016.

SCHWAB, J. P.; BECHTEL, M. A. B.; SCHUCH, D. M. T. *Listeria monocytogenes* em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 1996.

SCHWARZ, S.; CARDOSO, M.; WEGENER, H.C. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. **Antimicrobial Agentes Chemotherapy**. 36, 580-588, 1992.

SCHWARZ, S.; FEBLER, A.T.; HAUSCHILD, T.; KEHRENBERG, C.; KADLEC, K. Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in *Staphylococci*. *Annual N.Y. Academi Scientiae*. 1241, 82-103, 2011.

SCHWARZ, S.; GREGORY, P.D.; WERCKENTHIN, C.; CURNOCK, S.; DYKE, K.G. A novel plasmid from *Staphylococcus epidermidis* specifying resistance to kanamycin, neomycin and tetracycline. **Journal Medical Microbiology**. 45, 57-63, 1996.

SCHWARZ, S.; KADLEC, K.; STROMMENDER, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the Bft-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 61, 282-285, 2008.

SCHWARZ, S.; LANGE, C.; WERCKENTHIN, C. Molecular analysis of the macrolide-lincosamide resistance gene region of a novel plasmid from *Staphylococcus hyicus*. **Journal Medical Microbiology**. 47, 63-70, 1998.

SCHWARZ, S.; ROBERTS, M.C.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y.; LANGE, C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**. 63, 217-227, 1998b.

SCHWARZ, S.; WANG, Z. Tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius*. **Lett. Applied Microbiology**. 17, 88-91, 1993.

SEGRETI J, JONES R N, BERTINO J S. Challenges in assessing microbial susceptibility and predicting clinical response to newer-generation fluoroquinolones. **J Ocul Pharmacor Ther** 2012; 21 (1): 3-11.

SEIFI, N.; KAHANI, N.; ASKARI, E.; MAHDIPOUR, S.; NASAB NADERI, M. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. **Iran J Microbiol**, 4(2): 82-86, 2012.

SERIDAN, B. *et al.* Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.2, p.465-470, 2012.

SHALLCROSS, L. J.; FRAGASZY, E.; JOHNSON, A. M.; HAYWARD, A. C. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 43-54, 2013.

SHINOHARA, S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*. Rio de Janeiro, v. 13, p. 1669-1674, 2008.

SHOPSIN, B. *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microb.** 37: 3556-3563, 1999.

SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; WADDINGTON, M.; RIEHMAN, M.; KREISWIRTH, B.N. Use of Coagulase Gene (coa) Repeat Region Nucleotide Sequences for Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Sept. 2000, p. 3453–3456, v. 38, nº. 9.

SHORE, A.C. *et al.* Detection of *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 55: 3765–73, 2011.

SIBBALD, M.J. *et al.* Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. **Microbiology and Molecular Biology Review**.70:755–88, 2006.

SILVA JR, E. A. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 6ª ed. São Paulo: Varela, 2010. 625 p.

SILVA, A, F.; PORCY, C. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina no hospital de emergências de Macapá/AP/Brasil. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, nº 2, 2016.

SILVA, F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializado no sudoeste do paraná. B CEPPA, Curitiba, v. 33, nº2, 2015.

SILVA, J. F. Q., FILIZOLA, L. R. S., MAIA, M. M. D. & SENA, M. J. Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico sanitários de queijo Prato comercializado em supermercados e feiras livres de Recife-PE. **Revista de Medicina Veterinária**, 1, 21-25, 2011.

SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9: 669-81, 2014.

SINGH, R.; RAY, P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. **Future Microbiol** 9: 669-81, 2014.

SKOV, R.L.; JENSEN, K.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. *J Hosp Infect.* v.73(4), p.364-370, 2009.

SMITH, T.C. AND PEARSON, N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 11: 327-339, 2011.

SOUSA, R. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente, em Fortaleza, CE. **Hig. Aliment.**, v. 20, n. 138, p. 66-69, 2006.

SOUZA, R. R. *et al.* Biofilm formation and prevalence of *lukF-pv*, *seb*, *sec* and *tst* genes among hospital and community-acquired isolates of some international methicillin resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **Clin Microbiol Infect** 15(2): 203-207, 81, 2009.

SPANU, V. *et al.* Antibiotic Resistance Traits and Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Sheep Milk Cheese. **Journal of Food Science**, v. 79, nº10, 2014.

SPOHR, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in Southwest Germany. *Zoonoses Public Health* 58:252–261, 2011.

STAPLETON P. D.; SHAH, S.; EHLERT K.; HARA, Y.; TAYLOR, P.W. The β -lactam-resistance modifier-epicatechingallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2093–2103, 2007.

STAPLETON P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Sci. Prog.**, v. 85, n. 1, p. 57–72. 2002.

STEFANI, S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal Antimicrobial Agents**. 39:273-282, 2012.

STROMMENGER, B. *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 57, 461-465, 2006.

STRYJEWSKI, M.E.; COREY, G.R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, Volume 58, Issue suppl_1, 1 January 2014, Pages S10–S19.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 251–258, 1998.

TAMANINI, R. *et al.* Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semin., Ciênc. Agrár.**, v. 33, n. 5, p. 1877-1888, 2012.

TAREKGNE, E. *et al.* *Staphylococcus aureus* and other 728 staphylococcus species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. **Afr. J. Food Sci.** 729 9, 567-576, 2015.

TEIXEIRA, J.P.; SILVA, N.; FONSECA, L.M.; COSTA, G.M. Detection of *femA* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk using duplex PCR and determination of the minimum inhibitory concentration of the isolates. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 272-279, 2014.

TENENHAUS-AZIZA, F.; DAUDIN, J. J.; MAFFRE, A.; SANAA, M. Risk-based approach for microbiological food safety management in the dairy industry: the case of *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from pasteurized milk. **Risk Analysis**, 34, 56-74, 2014.

TENOVER, F. C. *et al.* Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 407-415, 1994.

TENOVER, F. *et al.* Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**. 44, 108–118, 2006.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, n° 9-10, 755-763, 1999.

THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial Resistance in Agriculture. American Society Microbiology, v.7, n°2, 2016.

TIKOFISKY, L. L., J. W. BARLOW, C. SANTISTEBAN, AND Y. H. SCHUKKEN. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. **Microb. Drug Resist.** 9:S39–S45, 2003.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, n. 9, p. 1484-1490, 2011.

TODD, J.; FISHAUTM; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. **The Lancet.**; 312:1116-8, 1978.

TOLDRA, F. **Safety of meat and processed meat**. Berlim, Springer, 669p., 2009.

TORUKOGLU, H.; ERCELIK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. **Journal of Research (Science)**. 15: 145-151, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo, Atheneu, 2008.

TRABULSI, L.R.; TEIXEIRA, L.M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, L.R. Alterthum F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, p.175-82, 2004.

TRUONG-BOLDUC, Q. C., P. M. DUNMAN., J. STRAHILEVITZ, S. J. PROJAN, AND D. C. HOOPER. 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187:2395-2404.

TSUTSUURA, S.; SHIMAMURA, Y.; MURATA, M. Temperature dependence of the production of staphylococcal enterotoxin A by *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, Tokyo, v. 77, n. 1, p. 30-37, 2013.

TURNER, C. E.; SRISKANDAN, S. PantoneValentine leucocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. **Journal of Infection**, v. 71, p. 338-346, 2015.

ÜNAL, N.; ÇINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 2, p. 369-375, Feb. 2012.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of Staphylococcal enterotoxin C in milk. *International Dairy Journal*, v. 30, p. 103–107, 2013.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Prevalence of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, 171, p. 364-367, 2014.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative dermatitis. **Emergence Infection Disease**. 13, 1408-1410, 2007.

VAN HOEK, A.H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A.P.; AARTS, H.J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**. 2, 203, 2011.

VANDENESCH, F. *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying PantonValentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerg Infect Dis** ;9:978–84, 2003.

VANDERHAEGHEN W.; CERPENTIER T.; ADRIAENSEN C.; VICCA J.; HERMANS K.; BUTAYE P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiology*.144: 166–171, 2010a.

VANDERHAEGHEN, W.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiology and Infection**. 138, 606–625, 2010b.

VASUDEVAN, P. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v.92, p.179-185, 2003.

VAUTOR, E. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 197-199, 2007.

VAZQUEZ-BOLAND, J. *et al.* *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VERAS, J. F. *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 12, n. 4, p. 410-415, July 2008.

VERNOZY-RAZAND, C. *et al.* Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 490-494, 2004.

VESTERGAARD, M. *et al.* SCCmec type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spa type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in **Thailand**. **Front Microbiol.**; 3:103, 2012.

VESTERHOLM-NIELSEN, M. *et al.* Occurrence of the *bla_Z* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 40: 279-286, 1999.

VIÇOSA, G. N. *et al.* *egc* characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Int J Food Microbiol** ;165: 227–30, 2013.

VINHA, M.B. *et al.* Qualidade de queijos minas frescal produzidos e comercializados informalmente em agroindústrias familiares. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.6, n.4, p.51-60, 2016.

VISOTTO, R. G. *et al.* Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 70, n. 1, p. 8–15, 2011.

VON EIFF, C. *et al.* Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. **N Engl J Med.** 344(1):11-6, 2001.

VOSS, A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases.* 11, 1965–1966, 2005.

VOUILLAMOZ, J. *et al.* A new cephalosporin with high penicillin-binding protein 2a affinity and activity in experimental endocarditis due to homogeneously methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v. 48, n. 11, p. 4322–4327, 2004.

VYLETELOVÁ, M.; VLKOVÁ, H.; MANGA, I. Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase negative *Staphylococci* in raw milk manufacturing. *Czech, J. Food Sci.*, v. 29, Special Issue: S11–S16, 2011.

WALECKA, E.; MOLENDAN, J.; KARPISKOVA, R.; BANIA, J. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, 144, 440-445, 2011.

WALSH, C.; FANNING, S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens – a cause for concern? **Curr. Drug Targets.** 9:808-810, 2008.

WANG, G. *et al.* Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. *Food Control*, v. 50, p. 202-208, 2015.

WANG, X. *et al.* Antimicrobial Susceptibility and Molecular Typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Foods in Shaanxi, China. **Foodborne Pathogens and Disease.** v.11, 4, 2014.

WANG, X.M. *et al.* Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control*, v. 32, p. 153-158, 2013.

WARRINER, K. NAMVAR, A. Why is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science and Technology**, 20. 245-254, 2009.

WEESE, J.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. **ILAR J.** 51, 233-244, 2010.

WEESE, J.S.; ARCHAMBAULT, M.; WILLEY, B.M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. **Emergency and Infection Disease**.11: 430–5, 2005.

WEESE, J.S. *et al.* Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**.115,148–155, 2006.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**. 140, 418-429, 2010.

WEI, H.L.; CHIOU, C.S. Molecular subtyping of staphylococcus aureus from an outbreak associated with a food handler. **Epidemiology Infection**. 128, 15-20, 2002.

WENDLANDT, S. *et al.* The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical Microbiology* 303 338–349, 2013.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? **Annual Review Food Scienciae Technology**. 4, 117-139, 2013 a.

WENDLANDT, S. *et al.* Multidrug resistance genes in staphylococci from animal that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. **Trends in Microbiology**, v.23, n°1, 2015.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL, J-L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hycus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**. 32, 341-362, 2001.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **J. Dairy Sci**. 84:E151–E155, 2001.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.

WIELDERS, C.L. *et al.* In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet*, v. 357, pg. 1674-1675, 2001.

WILLIAMS, R. C.; GOLDEN, D. A. Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 3, p. 379-386, 2001.

WINN JR. W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, 2006.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, p. 321-325, 2000.

WITTE, W., STROMMENDER, B., STANEK, C., CUNY, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. **Emerging Infectious Diseases**. 13, 255–258, 2007.

WONG, G. R. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from raw milk. 2013. 53 f. These (Doctoral) – Universiti Malaysia Sarawak, UNIMAS, Sarawak, 2013.
WOOLHOUSE, M. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v 5;37, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**, 5th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 978-92-4-151222-0. 12. World Organisation for Animal Health. Available online: <http://www.oie.int/en/> (accessed on 27 March 2017). 13. Anonymous. OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. World Organisation for Animal Health (OIE), 2015. Available online: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/veterinary-products/antimicrobials/> (accessed on 27 March 2017).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. WHO: Switzerland, 255 p., Dec. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/>. Acesso em: 03 fev. 2017.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; Y.E, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**.v.8(7),2016.

WU, S.; PISCITELLI, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. **Microb Drug Resist** ,v. 2 (pg. 435 -41), 1996.

XU, J. *et al.* Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Traits of Foodborne *Staphylococcus aureus* Isolates from Shanghai. **Journal of Food Science**, v.79, nº.4, 2014.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6129–6134, 2014.

YAMAGUCHI, M. U. *et al.* Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: Pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 417-434, set./dez. 2013.

YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, p. 1620-1625, 2003.

YAZDANKHAH, S.P. *et al.* Comparison of genes involved in penicillin resistance in staphylococci of bovine origin. **Microbial Drug Resistance**. 6: 29-36, 2000.

YE, H. F. *et al.* Are *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes transferring from food isolates to carriage isolates of staphylococci? **J. Hosp. Infect.** 80:95-96, 2012.

YOKOMIZO, Y. *et al.* Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p. 299-305, 1995.

YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial resistance Profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**. v8, 3, 2011.

YURDAKUL, N. E.; ERGINKAYA, Z.; UNAL, E. antibiotic resistance of Enterococci Coagulase Negativa Staphylococci and *Staphylococcus aureus* isoalted from chicken meat. **Czec J. Food Sci.** 31: 14-9, 2013.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

ZANKARI, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother.** 2012 Jul 10.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bull Int Dairy Fed.** 1(345):15-8, 2000.

ZEGARRA, J. J. Q. *et al.* Pesquisa de micro-organismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.1, p.312-321, 2009.

ZELL, C. *et al.* Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 246-251, Oct. 2008.

ZHANG, W.; JAYARAO, B. M.; KNABEL, S. J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 913-920, 2004.

ZHAO, S. *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. **J. Clin. Microbiol.** 41:5366–5371, 2003.

ZOCHE, F.; BASTO, C. P.; DA SILVA, W. P. Detecção de genes do cluster *egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. **Ciência Rural**, 40, 1134-1140, 2010.

ZOCICHE, F. *et al.* PCR multiples para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, Venezuela, v. 34, n. 7, p. 487-491, jul. 2009.

ZOCICHE, F.; SILVA, W. P. PCR para Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotogênicos em queijo Minas frescal. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 23 p. 187-193, 2012.

ZUTIC, M. *et al.* Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. **Afric. J. Microbiol. Res.**, v. 6, n. 29, p. 20

APÊNDICE A - Origem e características de 83 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados em queijos coloniais comercializados em Feiras Modelo e Mercado Público de Porto Alegre.

(continua)

Amostra	Origem		Quantificação	Genotipagem	Fatores de virulência				Fenótipos de resistência	
	Ponto de amostragem	Marca	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Spa type	Entrotoxinas	Leucocidinas		Genes de resistência		
						<i>lukS-F</i>	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>		
1	M1	C	4 x10 ²	t002	seA	-	-	-	ERY	
2	M1	F	7,5 x10 ⁵	unknown	-	-	-	-	-	
6	M2	F	8,49 x10 ⁵	t127	seC	-	-	-	-	
7	M2	C	5,6 x10 ³	t002	seA	-	-	-	-	
8	M3	C	2,6 x10 ³	t127	-	-	-	-	-	
10	M3	F	3,5 x10 ⁵	t127	-	-	-	-	-	
12	M4	C	9,46 x10 ⁵	unknown	-	-	-	-	-	
13	M4	F	4,21 x10 ⁵	t177	-	-	-	-	-	
14	M5	F	1,75 x10 ⁶	t189	-	-	+	-	PEN, TET	
15	M5	I	7,8 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-	
18	M5	C	3,5 x10 ⁵	t002	-	-	+	-	PEN, ERY	
22	M7	C	1,48 x10 ⁴	unknown	-	-	-	-	-	
23	F2	M	5 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-	
26	F3	C	2,1 x10 ³	t127	-	-	-	-	-	
29	M1	F	3,2 x10 ³	t571	seA	-	+	-	CIP, GEN, PEN, TET	
32	M2	C	5,27 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-	
33	M3	C	8 x10 ²	unknown	-	-	-	-	-	
35	M3	F	2 x10 ⁴	t571	-	-	+	-	CIP, GEN, PEN, TET	
36	F6	C	4 x10 ²	t306	-	-	-	-	-	
37	F6	F	2,2 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-	
40	F6	F	1,1 x10 ⁴	t2207	-	-	-	-	-	

(continuação)

Amostra	Quantificação			Genotipagem	Fatores de virulência				Fenótipos de resistência
	Origem		<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>		Entrotoxinas	Genes de resistência			
	Ponto de amostragem	Marca				UFC/g	Spa type	Leucocidinas	
41	F6	F	9,6 x10 ⁴	t189	-	-	+	-	PEN
43	F7	D	7 x10 ⁴	t067	seA	-	-	-	-
44	F7	F	6,12 x10 ⁵	unknown	-	-	-	-	CIP
48	F8	F	6,6 x10 ³	unknown	-	-	-	-	-
49	F5	D	7,28 x10 ⁵	t002	seC	-	-	-	-
50	F5	F	1,4 x10 ⁴	unknown	-	-	-	-	-
51	F4	C	4 x10 ⁵	t189	seA	-	-	-	-
53	F4	F	5 x10 ⁴	unknown	-	-	-	-	-
54	F4	H	2,5 x10 ³	t045	seA	-	-	-	CIP
56	F1	H	2,7 x10 ⁴	t002	seA	-	+	-	PEN
57	F1	F	4 x10 ²	s/spa	-	-	+	-	-
61	F2	J	5,6 x10 ²	t127	-	-	+	-	ERY
64	F3	F	1,72 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
65	F3	Q	4,2 x10 ³	t045	-	-	+	-	PEN
66	F5	F	1 x10 ⁴	t948	-	-	-	-	-
67	F5	D	1,5 x10 ⁶	t127	-	-	+	-	-
68	F4	H	2,1 x10 ⁴	t002	seC	-	+	-	PEN, ERY
71	F4	F	6 x10 ³	t127	-	-	-	-	-
72	F6	F	6 x10 ²	t1471	seA	-	+	-	ERY, PEN, TET
73	F6	F	6,4 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
74	F6	H	4 x10 ³	t002	-	-	+	-	PEN, ERY
80	M5	D	7,6 x10 ³	t127	-	-	-	-	-
86	M7	C	1,8 x10 ⁴	t002	-	-	+	-	PEN

(continuação)

Amostra	Origem		Quantificação	Genotipagem	Fatores de virulência			Fenótipos de resistência	
	Ponto de amostragem	Marca	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>		Entrotoxinas	Leucocidinas	Genes de resistência		
			UFC/g	Spa type					<i>lukS-F</i>
91	M3	P	2,4 x10 ³	t127	seC	-	-	-	-
95	M5	D	1,73 x10 ⁶	t127	-	-	-	-	-
101	M1	P	2 x10 ²	t127	-	-	-	-	-
108	F6	H	5,2 x10 ³	t1094	-	-	+	-	PEN, ERY
111	F6	F	1,4 x10 ³	t127	-	-	-	-	-
112	F7	D	1,8 x10 ⁵	t127	-	-	-	-	-
115	M7	P	2,4 x10 ²	t5229	-	-	-	-	-
118	M1	P	3,6 x10 ²	t127	-	-	-	-	-
122	M4	P	1 x10 ²	t002	-	-	+	-	PEN
127	F1	H	1,59 x10 ⁶	t002	-	-	-	-	-
129	F1	J	2 x10 ²	t1451	-	-	-	-	ERY
130	F8	H	3,7 x10 ⁶	t002	-	-	-	-	-
133	F8	F	1,4 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
134	F5	D	3,8 x10 ⁵	t127	seC	-	-	-	-
136	F5	Q	4 x10 ³	t571	-	-	+	-	CIP, GEN, PEN, TET
137	F5	Q	5 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
140	F4	C	3,21 x10 ⁵	t002	-	-	-	-	-
142	F3	F	1,2 x10 ³	t189	-	-	+	-	PEN
146	F2	F	1,8 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
148	F5	D	2,7 x10 ⁴	t127	-	-	-	-	-
149	F5	Q	4 x10 ²	t1094	seC	-	+	-	PEN
152	F5	D	2 x10 ³	t127	-	-	-	-	-

(conclusão)

Amostra	Origem		Quantificação	Genotipagem	Fatores de virulência			Fenótipos de resistência	
	Ponto de amostragem	Marca	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Spa type	Entrotoxinas	Genes de resistência			
			UFC/g			Leucocidinas	<i>blaZ</i>		<i>mecA</i>
153	F5	Q	2 x10 ³	unknown	-	-	-	-	
157	M1	P	8,5 x10 ⁵	t571	-	-	+	-	CIP, GEN, PEN, TET
160	M5	P	4 x10 ²	t002	-	-	-	-	-
176	F8	H	8,4 x10 ⁵	t1094	-	-	+	-	PEN
180	F5	D	2 x10 ⁶	t127	-	-	-	-	-
182	F5	F	2,5 x10 ³	t127	-	-	-	-	-
184	F2	K	4 x10 ⁴	t337	-	-	+	-	PEN, CIP
186	F7	G	1,4 x10 ⁴	t002	-	-	+	-	PEN
187	F7	D	2,5 x10 ⁶	t127	-	-	-	-	-
188	F6	H	5,84 x10 ⁵	t002	-	-	+	-	-
190	F6	F	1,5 x10 ⁵	t002	-	-	-	-	-
194	F6	F	1 x10 ²	t337	-	-	-	-	CIP
197	F8	J	1,64 x10 ⁵	t002	-	-	-	-	-
198	F1	F	1,1 x10 ⁵	t088	-	-	+	-	PEN
199	F1	H	2,45 x10 ⁶	t002	-	-	-	-	-
202	F6	F	4 x10 ³	t189	-	-	+	-	PEN
205	F6	H	1,5 x10 ⁶	t442	-	-	-	-	-

Unknown número de repetições não cadastradas no banco de dados de *ridom spa typing*

- indicam ausência de genes ou perfis fenotípicos

+indica presença do gene *blaZ*.