

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

**PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE NEGATIVA EM QUEIJO
COLONIAL INSPECIONADO: IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE GENES DE
ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS E DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E À
METICILINA**

TATIANA REGINA VIEIRA

PORTO ALEGRE

2017

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

**PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE NEGATIVA EM QUEIJO
COLONIAL INSPECIONADO: IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE GENES DE
ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS E DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E À
METICILINA**

Autora: Tatiana Regina Vieira

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

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

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Tatiana Regina
Pesquisa de *Staphylococcus* spp. coagulase
negativa em queijo colonial inspecionado:
identificação, perfil de genes de enterotoxinas
clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina
/ Tatiana Regina Vieira. -- 2017.
85 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Queijo colonial. 2. Enterotoxinas. 3.
Staphylococcus coagulase negativa. 4. Resistência.
5. Beta-lactâmicos. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de
Itapema, orient. II. Título.

Tatiana Regina Vieira

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. COAGULASE NEGATIVA EM QUEIJO COLONIAL INSPECIONADO: IDENTIFICAÇÃO, PERFIL DE GENES DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS E DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E À METICILINA.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2017.

APROVADO POR

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

APROVADO POR

Dr. Denis Spricigo
Membro da Comissão

APROVADO POR

Prof^ª. Dra. Márcia Monks Jantzen
Membro da Comissão

APROVADO POR

Membro da Comissão
Prof^ª. Dra. Verônica Schmidt

*Dedico ao meu esposo, Cleverson, 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.

À Thais Ausani por compartilhar comigo as amostras do seu projeto de Doutorado.

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 com quem desde a graduação venho aprendendo muito e que levarei sempre comigo. Aos parceiros do Lab. 3, Caroline, Cíntia, Claudia, Daniel, Graciela, Gabriela, Jordânia, Laura, Thaís e Vanessa que acompanharam mais de perto esses últimos dois anos, compartilhando comigo suas descobertas, angústias e alegrias.

À Dona Berna, por todo carinho e dedicação.

Aos meus amigos Daniel e Gabriela que desde os tempos de Iniciação Científica, quando as metas eram o destaque no Salão de Iniciação Científica e não voltar para o Laboratório sem sangue, me apoiaram para seguir em busca desta realização.

À minha família pelo amor e carinho demonstrados.

Ao meu esposo, cuja parceria, apoio e compreensão, foram essenciais para que eu não desistisse desse sonho.

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

RESUMO

A pesquisa de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (CNS) em alimentos não é prevista na legislação, entretanto, estas bactérias têm emergido como patógenos oportunistas e sua capacidade enterotoxigênica já foi documentada. O queijo destaca-se entre os principais derivados lácteos associados a intoxicações alimentares e a presença de cepas enterotoxigênicas do gênero *Staphylococcus* neste alimento representa um risco ao consumidor. O queijo colonial, tradicionalmente consumido pelos gaúchos, não possui regulamento técnico específico e poucos são os estudos relacionados ao risco do consumo desse alimento, bem como, à identificação de micro-organismos presentes nessa matriz. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram: (i) identificar as espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, presentes em queijo colonial inspecionado; (ii) pesquisar a presença de genes codificadores de enterotoxinas clássicas (SE), bem como de resistência à penicilina e à meticilina nas cepas isoladas desta matriz. Para tanto, no período de novembro de 2014 a maio de 2015, foram analisadas 205 amostras de queijos coloniais inspecionados, sendo 121 adquiridas em Feiras Modelo e 84 em bancas do Mercado Público de Porto Alegre, compreendendo 17 marcas distintas. O isolamento inicial de *Staphylococcus* spp. foi realizado de acordo com o protocolo ISO 6888-1:1999, adicionado da triagem fenotípica para CNS. A identificação genotípica dos isolados foi realizada pela amplificação da região V1-V2 do gene 16S rRNA, seguida de sequenciamento e comparação das sequências obtidas no *GenBank*. A pesquisa de genes de enterotoxinas clássicas foi realizada por amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*. A determinação de resistência à penicilina foi avaliada a partir da amplificação do gene *blaZ*. Para resistência à meticilina, foi realizado teste de triagem frente à cefoxitina, e confirmação pela pesquisa do gene *mecA*. O armazenamento sob refrigeração foi observado em quase 90% das amostras coletadas. Entre as 179 colônias retiradas do ágar Baird-Parker, 59 apresentaram-se fenotipicamente compatíveis com CNS e foram identificadas genotipicamente. Treze espécies foram identificadas, sendo *Macrococcus caseolyticus* (40%) a mais frequente. Das 35 cepas confirmadas como CNS, *S. equorum* e *S. vitulinus* foram as espécies predominantes seguidas de *S. hyicus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*. O gene *blaZ* foi detectado em cinco cepas de CNS e em uma cepa de *M. caseolyticus*, sendo relativamente mais frequente em *S. hyicus* e *S. epidermidis*. O gene *mecA* não foi detectado. Oito cepas de CNS amplificaram algum gene para SE, sendo *seb* o mais frequente, seguido por *sed*, *sea* e *see*. O gene para enterotoxina C não foi detectado. Onze cepas apresentaram pelo menos um dos genes investigados, das quais, seis cepas apresentaram genes para SE e *blaZ*, concomitantemente. Os perfis *seb/blaZ* (n=4) e *blaZ* (n=3) foram os mais frequentes. Foi possível confirmar a diversidade de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa em queijos coloniais inspecionados, além da baixa frequência de cepas carreadoras de genes para enterotoxinas clássicas e resistência à penicilina e à meticilina.

Palavras-chave: Queijo colonial, *Staphylococcus* coagulase-negativa, enterotoxinas, resistência, β -lactâmicos.

ABSTRACT

The investigation of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS) is not included in food monitoring; although these bacteria have emerged as significant opportunistic pathogens and their toxigenic capacity has been documented. Among the dairy products, cheese features as one of the most involved in food poisoning outbreaks. The presence of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* in this food therefore represents a hazard for the consumers. Colonial cheese, which is a traditionally consumed cheese type in Rio Grande do Sul, does not have a specific technical regulation, and there are few studies targeting the risk for consumers, or aiming to identify its typical microbiota. Thus, the objectives of this study were: (i) to identify coagulase-negative *Staphylococcus* spp. species in inspected colonial cheese (ii) to investigate the presence of genes encoding classical enterotoxins (SE), and resistance to penicillin and methicillin in strains obtained from this food. For this purpose, from November 2014 to May 2015, 205 cheese samples were analyzed, 121 of which were acquired in street fairs and 84 in Central Market. The samples belonged to 17 different brands. The isolation of *Staphylococcus* spp. was performed according to the ISO 6888-1: 1999 protocol, followed by the phenotypic screening of CNS. The genotype identification of the isolates was performed by amplification of the V1-V2 region of the 16S rRNA gene, followed by sequencing and the sequences comparison with the GenBank database. Classical enterotoxin genes were investigated by amplification of *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes. The determination of penicillin resistance was evaluated by the amplification of *blaZ* gene. For methicillin resistance, a screening test with cefoxitin was conducted followed by confirmation through the *mecA* amplification. The majority (89,7%) of the collected samples were stored under refrigeration. Among the 179 atypical colonies obtained from Baird-Parker agar, 59 were phenotypically compatible with CNS and were further subjected to genotyping. Thirteen bacterial species were identified, being *Macrocooccus caseolyticus* the most frequent (40%). Thirty-five strains were confirmed as CNS, being *S. equorum* and *S. vitulinus* the most prevalent followed by *S. hyicus*, *S. saprophyticus* and *S. epidermidis*. The gene *blaZ* was detected in five strains of CNS and in one strain of *M. caseolyticus*, being relatively more frequent in *S. hyicus* and *S. warneri*. The *mecA* gene was not detected. Eight CNS strains amplified SE gene: SEB was the most frequent, followed by SED, SEA and SEE. There was no enterotoxin C gene detected. Eleven strains carried at least one of the genes investigated; six strains presented genes for SE and *blaZ*, concomitantly. The profiles SEB/*blaZ* (n = 4) and *blaZ* (n = 3) were the most frequent. The diversity of CNS in inspected colonial cheeses was confirmed. In addition, the low frequency of strains carrying genes for enterotoxins and resistance to penicillin and methicillin was observed.

Keywords: colonial cheese, coagulase-negative *Staphylococcus*, enterotoxins, resistance, β -lactams

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. e suas características de acordo com os testes de coagulase e suscetibilidade à novobiocina.....	15
Tabela 2	– Localização dos genes que codificam enterotoxinas clássicas em <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
Tabela 3	– Fatores que afetam o crescimento bacteriano e a produção de enterotoxinas por <i>S. aureus</i>	34
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.....	38
Tabela 5	– Interpretação dos halos de inibição de bacitracina e furazolidona em teste de disco-difusão para identificação de gêneros da família <i>Staphylococcaceae</i>	41
Tabela 6	– Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações para a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SE).....	45
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.....	46
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.....	49
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.....	50
Tabela 10	– Mediana, número mínimo e máximo de colônias típicas e atípicas de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos em ágar Baird-Parker observados em amostras de 17 marcas de queijo colonial.....	51

Tabela 11	– Identificação de 59 cepas bacterianas originadas de amostras de queijo colonial, por testes fenotípicos e sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S rRNA.....	52
Tabela 12	– Presença do gene blaZ e genes de enterotoxinas clássicas em cepas do gênero <i>Micrococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> isoladas de queijo colonial.....	53
Tabela 13	– Espécies identificadas por sequenciamento com sua origem e fatores de virulência.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.....	14
2.1.2	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa.....	19
2.2	Identificação	21
2.3	Resistência à penicilina e meticilina	24
2.4	Enterotoxinas clássicas	28
2.5	Intoxicação alimentar estafilocócica	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Delineamento do estudo.....	36
3.2	Processamento laboratorial das amostras de queijo.....	38
3.3	Triagem de cocos Gram positivos coagulase-negativos.....	39
3.4.	Identificação fenotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	40
3.4.1	Teste de oxidação e fermentação (OF)	40
3.4.2	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	40
3.4.3	Teste de suscetibilidade à lisostafina	41
3.5	Identificação genotípica de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.....	41
3.5.1	Extração de DNA.....	42
3.5.2	Amplificação da região V1-V2 do gene 16S rRNA	42
3.5.3	Sequenciamento dos fragmentos da região V1-V2 do 16S rRNA.....	43
3.6	Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas.....	44
3.7	Pesquisa de resistência à penicilina e meticilina	46
3.7.1	Pesquisa do gene blaZ.....	46
3.7.2	Resistência à meticilina.....	47
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A.....	83

1 INTRODUÇÃO

O queijo está entre os derivados lácteos mais consumidos no País, chegando a 5,4 kg habitante.ano⁻¹ em 2015. Ainda neste ano, o mercado brasileiro de queijos movimentou mais de 19 bilhões de reais. Além disso, projeções de mercado indicam aumento do consumo nos próximos anos, podendo chegar a 8 kg por habitante em 2017 (CARVALHO; VENTURINI; GALAN, 2015). Segundo Fernandez e Zanela (2009), os queijos ocupam lugar de destaque no consumo de derivados lácteos entre os consumidores porto alegrenses.

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.

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, um 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). 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).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) 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 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), estima que mais de um terço da população mundial adoça por essas enfermidades todos os anos. No período compreendido entre 2007 e 2016, foram notificados mais de 6 mil surtos de DTA no Brasil e mais de 120 mil pessoas adoeceram após a ingestão de alimentos contaminados (BRASIL, 2016).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças alimentares mais comuns no mundo (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012) e está relacionada à ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento, produzidas, principalmente por *S. aureus*, no entanto, outras espécies já foram identificadas em alimentos associados a surtos (CARMO *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2008). Existe uma grande diversidade de enterotoxinas estafilocócicas (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010), contudo, as enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são responsáveis pela maioria dos surtos investigados (BALABAN; RASOOLY, 2000; VERNZOZY-ROZAND *et al.*, 2004; CREMONESI *et al.*, 2005; CHAVES, 2012; SATO'O *et al.*, 2014).

Embora *S. aureus* seja considerado o principal responsável por produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012), a capacidade enterotoxigênica de espécies coagulase negativa já foi confirmada, indicando a possibilidade de que *Staphylococcus* coagulase negativos (CNSs) possam estar envolvidos em intoxicações alimentares (CARMO *et al.*, 2002; LAMAITA *et al.*, 2005; OTTO, 2009; PIETTI; VERSCHRAEGEN, 2009; MAZZARIOL *et al.*, 2012; ÜNAL; ÇINAR, 2012). Apesar disso, a legislação brasileira que regulamenta os padrões de qualidade microbiológica de alimentos não preconiza a pesquisa destas bactérias em alimentos envolvidos em surtos (BRASIL, 2001), contribuindo, desta forma, para a falta de dados quanto a sua presença nesses eventos.

Adicionado a possibilidade de estarem envolvidos em intoxicações alimentares, CNS são importantes patógenos oportunistas relacionados a infecções em humanos e animais e tem sido reportado como uma das principais causas de infecções hospitalares, inclusive com a presença de cepas multirresistentes. A presença de cepas enterotoxigênicas e que carregam genes de resistência podem ser consideradas um problema de saúde pública, à medida que estas bactérias podem 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 micro-organismos resistentes entre o ambiente e humanos (FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016).

Estudos pesquisaram a comunidade de CNS em queijos e em outros alimentos, confirmando o potencial dessas bactérias como carreadoras de genes que codificam enterotoxinas e/ou resistência à antimicrobianos (RALL *et al.*, 2010; KÜREKCI, 2016; NUNES *et al.*, 2016), porém, a investigação de CNS em queijo colonial, produto típico do Rio Grande do Sul, ainda é escassa.

Considerando o exposto, os objetivos do presente estudo foram: (i) identificar espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, presentes em queijo colonial inspecionado, comercializado em Feiras Modelo e Mercado Público na cidade de Porto Alegre; (ii) pesquisar a presença de genes codificadores de enterotoxinas clássicas, e de resistência à penicilina e à meticilina nas cepas isoladas dessa matriz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2016). Está inserido no filo Firmicutes, composto por bactérias Gram positivas com baixo teor de G-C e, desde 2010, pertence à família *Staphylococcaceae* juntamente com os gêneros *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* e *Salinicoccus* (SCHLEIFER; BELL, 2009).

O primeiro relato de um representante desse gênero ocorreu em 1878, quando Robert Koch isolou a bactéria de uma lesão purulenta. Depois disso, em 1883, Alexander Ogston denominou “*Staphylococcus*” a uma bactéria em forma de cocos agrupados, que estava causando inflamação e supuração. No entanto, a descrição formal do gênero somente ocorreu em 1884, por Rosenbach, que, na ocasião, dividiu o gênero em duas espécies: *S. aureus* e *S. albus* (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006).

Mesmo com os primeiros relatos de um novo gênero, restavam questões a serem respondidas quanto à classificação exata deste procaríoto. As pesquisas continuaram considerando a morfologia e arranjo das colônias e a diferença no metabolismo bacteriano como a ação de gelatinase (liquefação da gelatina), metabolismo na presença de oxigênio, suscetibilidade à lisostafina, perfil de citocromo, entre outros. Em 1981, após estudos de hibridização de ácido desoxirribonucleico (DNA – sigla em inglês) e comparação do gene 16S rRNA, foi comprovado que as bactérias em questão, classificadas por algum tempo como *Micrococcus*, eram de fato um gênero diferente estabelecendo-se, assim, dois gêneros distintos como conhecemos hoje - *Staphylococcus* e *Micrococcus* (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006).

O gênero *Staphylococcus* é representado por cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, com arranjo isolado, aos pares, em cadeias curtas ou em agregados com forma de cachos de uva. Raramente apresentam cápsula e suas colônias podem ser brancas, creme, amarela ou laranja. 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* spp. (SCHLEIFER; BELL, 2009).

Ainda quanto às características metabólicas, *Staphylococcus* spp. crescem sob pressão osmótica alta, são resistentes ao dessecamento e toleram altas concentrações de sal (até 10% NaCl). Mesófilas, tem sua 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).

Embora tenham sido, inicialmente, isolados de sítios de infecção, podem ser encontradas 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 micro-organismo 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: coagulase positiva e coagulase negativa. A produção de coagulase resulta na capacidade de converter o fibrinogênio em fibrina.

Na Tabela 1 estão listadas as espécies já identificadas de *Staphylococcus*, constantes da lista oficial de procariontes (EUZÉBY, 2016). Por questões de referência, foram mantidas ainda nesta lista as 52 espécies, considerando a presença de *S. pulvereri* (idêntica a *S. vitulinus*) e *S. caseolyticus* (transferido para o gênero *Macrococcus*) (KLOOS *et al.*, 1998; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Tabela 1 – Espécies de *Staphylococcus* spp. e suas características de acordo com os testes de coagulase e suscetibilidade à novobiocina.

(continua)				
Espécie	Ano de inclusão	Fonte	Coagulase	Suscetibilidade à novobiocina
<i>S. agnetis</i>	2012	Bovino – Mastite	Variável ¹	Suscetível
<i>S. argensis</i>	2015	Ambiente aquático	Negativa	Suscetível
<i>S. argenteus</i>	2015	Primata não humano	Positiva	Suscetível
<i>S. arlettae</i>	1985	Aves e caprinos	Negativa	Resistente
<i>S. aureus</i>	1884	Fluído pleural	Positiva	Suscetível
<i>S. auricularis</i>	1983	Humano	Negativa	Suscetível

(continuação)				
Espécie	Ano de inclusão	Fonte	Coagulase	Suscetibilidade à novobiocina
<i>S. capitis</i>	1975	Humano (pele)	Negativa	Suscetível
<i>S. caprae</i>	1983	Cabra (leite)	Negativa	Suscetível
<i>S. carnosus</i>	1982	Salsicha	Negativa	Suscetível
<i>S. caseolyticus</i> ²	1916	Bovino (leite)	Negativa	Suscetível
<i>S. chromogenes</i>	1978	Suínos, aves e bovino	Negativa	Suscetível
<i>S. cohnii</i>	1975	Humanos e outros primatas (pele)	Negativa	Resistente
<i>S. condimenti</i>	1998	Molho de soja	Negativa	Suscetível
<i>S. delphini</i>	1988	Golfinhos (pele)	Positiva	Suscetível
<i>S. devriesei</i>	2010	Leite	Negativa	Suscetível
<i>S. epidermidis</i>	1908	Pele	Negativa	Suscetível
<i>S. equorum</i>	1985	Cavalo	Negativa	Variável ¹
<i>S. felis</i>	1989	Gatos	Negativa	Suscetível
<i>S. fleurettii</i>	2000	Queijo de cabra	Negativa	Resistente
<i>S. gallinarum</i>	1983	Aves	Negativa	Resistente
<i>S. haemolyticus</i>	1975	Humanos e outros primatas	Negativa	Suscetível
<i>S. hominis</i>	1975	Pele	Negativa	Variável ¹
<i>S. hyicus</i>	1953	Suínos, aves e bovino (pele)	Variável ¹	Suscetível
<i>S. intermedius</i>	1976	Mucosas e pele de cães e equinos.	Positiva	Suscetível
<i>S. jettensis</i>	2013	Humanos	Negativa	Suscetível
<i>S. kloosii</i>	1985	Pele	Negativa	Resistente
<i>S. lentus</i>	1976	Ovelhas e cabras	Negativa	Resistente
<i>S. lugdunensis</i>	1988	Linfonodo axilar	Negativa	Suscetível
<i>S. lutrae</i>	1997	Lontras	Positiva	Suscetível
<i>S. massiliensis</i>	2010	Humano (abscesso)	Negativa	Suscetível
<i>S. microti</i>	2010	Ratazana	Negativa	Suscetível
<i>S. muscae</i>	1992	Moscas	Negativa	Suscetível
<i>S. nepalensis</i>	2003	Cabra	Negativa	Resistente
<i>S. pasteuri</i>	1993	Humanos, animais, alimentos	Negativa	Suscetível
<i>S. petrasii</i>	2013	Humanos	Negativa	Suscetível
<i>S. pettenkoferi</i>	2007	Humanos (sangue)	Negativa	Suscetível
<i>S. piscifermentans</i>	1992	Peixe fermentado	Negativa	Suscetível
<i>S. pseudintermedius</i>	2005	Animais	Positiva	Suscetível
<i>S. pulvereri</i> ³	1995	Humanos e animais	Negativa	Resistente
<i>S. rostri</i>	2010	Suínos (fossas nasais)	Negativa	Suscetível
<i>S. saccharolyticus</i>	1948	Humano (pele)	Negativa	Suscetível

Espécie	Ano de inclusão	Fonte	Coagulase	(conclusão)
				Suscetibilidade à novobiocina
<i>S. saprophyticus</i>	1940	Humanos e animais (pele)	Negativa	Resistente
<i>S. schleiferi</i>	1988	Humanos - amostras clínicas	Variável ¹	Suscetível
<i>S. schweitzeri</i>	2015	Humanos - amostras clínicas	Positiva	ND
<i>S. sciuri</i>	1976	Animais, solo, água	Negativa	Resistente
<i>S. simiae</i>	2005	Macacos	Negativa	Suscetível
<i>S. simulans</i>	1975	Humanos e outros primatas (pele)	Negativa	Suscetível
<i>S. stepanovicii</i>	2012	Mamíferos selvagens	Negativa	Resistente
<i>S. succinus</i>	1998	Âmbar dominicano ⁴ , superfície de queijo ⁵	Negativa	Resistente
<i>S. vitulinus</i>	1994	Animais e carnes	Negativa	Resistente
<i>S. warneri</i>	1975	Humanos (pele)	Negativa	Suscetível
<i>S. xylosus</i>	1975	Humanos (pele)	Negativa	Resistente

(1) algumas cepas apresentam reação positiva para o teste enquanto outras são negativas. (2) reclassificado como *Macrococcus caseolyticus*. (3) idêntica à *S. vitulinus*. (4) *S. succinus* subsp. *succinus*. (5) *S. succinus* subsp. *casei*. ND: não determinado.

Fonte: SCHLEIFER; BELL, (2009); Euzéby (2016) - adaptada.

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. 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.

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. (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 (QUINN *et al.*, 2011; PANTOSTI, 2012). 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).

Outros *Staphylococcus* coagulase positiva podem ser importantes patógenos oportunistas, como é o caso de *S. intermedius* que pode causar piodermites, abscessos, infecções do trato reprodutivo, mastites e infecções de feridas em cães. *Staphylococcus hyicus* (coagulase variável), é o agente etiológico da epidermite exsudativa em suínos, mas pode, também, estar associado a infecções de pele em bovinos e cavalos, 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 intoxicação alimentar estafilocócica, causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas principalmente por *S. aureus*, é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns no mundo (HENNEKINE; BUYSER; DRAGACCI, 2012; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). 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; BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Embora o principal representante do gênero, *S. aureus*, seja coagulase positiva, a capacidade patogênica dos estafilococos não é exclusividade desse grupo. Outras espécies consideradas por muito tempo inofensivas, basicamente por não possuírem a capacidade de sintetizar a enzima coagulase, ganharam importância à medida que foram identificadas

em pacientes com sintomatologia clínica (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Das 52 espécies descritas até 2016, somente sete são coagulase positiva e três são variáveis. Os *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (CNS – sigla em inglês) hoje configuram uma das maiores preocupações em infecções hospitalares. Além disso, a confirmação de sua capacidade em expressar diversos fatores de virulência comuns ao *S. aureus*, a quantidade de representantes e heterogeneidade do grupo traz desafios para os clínicos e pesquisadores quanto ao seu papel na saúde pública, tanto em infecções em humanos e animais, quanto na produção segura de alimentos (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; IRLINGER, 2008; PODKOWIK *et al.*, 2013; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

2.1.2 *Staphylococcus* spp. coagulase negativa

Os *Staphylococcus* spp. coagulase negativa constituem a maior parte da microbiota natural da pele de humanos e animais (SCHLEIFER; BELL, 2009; QUINN *et al.*, 2011; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016). Como bactérias comensais podem inibir a colonização por patógenos (IWASE *et al.*, 2010) e na indústria são empregados como adjuvantes na promoção de características desejáveis em alimentos (IRLINGER, 2008). Entretanto, essas bactérias têm emergido como significantes patógenos oportunistas. A mudança no perfil da população humana, com o aumento no número de idosos com sistema imune menos ativo, pacientes imunocomprometidos e o crescente uso de próteses internas, podem ser algumas das causas para a emergência dessas bactérias como patógenos (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Em humanos, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*, são frequentemente isolados de amostras clínicas (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009; HITZENBICHLER *et al.*, 2016). Segundo Piette; Verschraegen (2009), apesar das diferenças dos isolados de CNS encontrados em pacientes humanos em diversos países, *S. epidermidis* representa 50% dos isolados de amostras clínicas. Está entre os mais envolvidos em infecções relacionadas a cateteres intravasculares, bacteremia, endocardite, infecções de feridas cirúrgicas, infecções oftalmológicas, infecções associadas à diálise peritoneal e infecções de articulações protéticas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016). Seu papel em infecções nosocomiais pode ser comparado ao *S. aureus*, considerando a dificuldade de tratamento devido à resistência a antimicrobianos como meticilina (*Methicillin-resistant*

Staphylococcus epidermidis - MRSE) e sua capacidade de formar biofilme (OTTO, 2009). Como colonizador de humanos, pode ser considerado benéfico uma vez que algumas de suas variantes demonstram a capacidade de inibir a colonização de *S. aureus* nas fossas nasais; essas variantes seriam capazes, inclusive, de destruir biofilmes pré-existentes de *S. aureus* (IWASE *et al.*, 2010).

Staphylococcus haemolyticus é o segundo membro mais frequente isolado de infecções clínicas em humanos. Esta espécie tem sido reportada em endocardites, septicemia, infecções do trato urinário, peritonite e infecções de feridas, ossos e articulações. Em infecções do trato urinário de mulheres jovens, a espécie de CNS mais frequente é *S. saprophyticus*, enquanto *S. lugdunensis* tem sido implicada em artrite, infecções por cateter, bacteremia, infecções do trato urinário, infecções articulares protéticas e endocardite (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; HASHMI *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2016).

Em animais, o quadro é semelhante ao de humanos, ou seja, a maioria das espécies de CNS é considerada não patogênica; no entanto, algumas espécies, apesar de consideradas com baixa virulência, podem causar doenças em animais. Espécies como *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xylosus*, são ocasionalmente isolados de mastite clínica e subclínica de ruminantes (QUINN *et al.*, 2011).

Como agentes de mastite, considerando o impacto na saúde do úbere, os CNS são classificados como patógenos menores (VANDERHAEGHEN *et al.*, 2015). Apesar da baixa lesão que ocorre no úbere, esses micro-organismos são a principal causa de mastite em ruminantes, sendo responsáveis por importantes perdas econômicas aos produtores de leite (IBRAHIM *et al.*, 2015; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2015).

Segundo Vanderhaeghen *et al.* (2015) as cinco espécies mais frequentes em infecções intramamárias (IMI) são *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. xylosus*. Ainda que existam lacunas na epidemiologia das IMI por CNS, os autores sugerem que a infecção por *S. chromogenes*, espécie adaptada à espécie bovina, seja de caráter oportunista, enquanto *S. epidermidis*, considerada adaptada à espécie humana, tenha os humanos como principal fonte de infecção (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009).

Os CNS são particularmente importantes na produção de alimentos, sendo responsáveis pela formação do aroma e a estabilização da cor em salsichas, salames e queijos. Espécies como *S. carnosus*, *S. xylosus* e *S. equorum* são frequentemente

utilizadas com segurança como culturas iniciadoras nos processos de fermentação (IRLINGER, 2008; JANSSENS *et al.*, 2013).

Apesar de não serem, normalmente, relacionados a intoxicações alimentares, algumas espécies já foram isoladas de alimentos prontos para o consumo e a sua importância tem sido investigada, principalmente como possíveis fontes de intoxicações alimentares e reservatórios de genes de resistência. Relacionando amostras clínicas e de alimentos, Coton *et al.* (2010) identificaram *S. epidermidis* e *S. capitis*, em ambas amostras. As principais cepas isoladas em alimentos foram *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. succinus*; contudo, nenhuma cepa alimentar apresentou perfil de eletroforese em gel de campo pulsado – PFGE similar aos isolados clínicos. Fijalkowski; Peitler; Karakulska (2016), isolaram nove espécies de CNS (*S. equorum*, *S. vitulinus*, *S. carnosus*, *S. succinus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. pasteurii*) de produtos prontos para o consumo à base de carne. Alguns isolados dessas espécies apresentaram resistência a antimicrobianos e capacidade para produção de enterotoxina. O potencial toxigênico de cepas de CNS isolados em queijos no Brasil também foi confirmado por Nunes *et al.* (2016), neste estudo, as principais espécies isoladas foram *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. pscifermentans*.

2.2 Identificação

A distinção fenotípica de coagulase negativa e positiva foi, por muito tempo, suficiente para determinar a conduta clínica, uma vez que se assumia que a patogenicidade dos *Staphylococcus* spp. estava ligada à produção da coagulase. No entanto, com o aumento da significância dos CNS e a quantidade de novas espécies descritas, esta diferenciação tem sido cada vez mais questionada. Muitas vezes, a identificação à nível de espécie é necessária para auxiliar a tomada de decisão quanto ao significado do isolamento.

Em 1951, Shaw; Stitt; Cowan (1951) utilizando as informações de Fairbrother (1940), que diferenciou o grupo pela produção da coagulase, propuseram uma das primeiras chaves de identificação fenotípica para estafilococos. Por esse critério, havia subdivisão em dois grupos, baseado no resultado do teste da coagulase. Adicionalmente, havia uma subdivisão secundária das estirpes negativas baseada na produção de ácido e acetoina a partir da glicose, além da fermentação de uma série de açúcares. Na ocasião, foram diferenciados cinco grupos: o grupo composto por todos os coagulase positivo

(grupo 1), considerado homogêneo; e os demais quatro grupos formados pelos coagulase negativo.

A capacidade de produção de ácido a partir da utilização anaeróbia da glicose somente foi considerada por Evans em 1955, distinguindo, então, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006). Nesta linha, em 1963, Baird-Parker, analisando 1.250 isolados aeróbicos, Gram positivos e catalase positivos propôs a sua classificação em seis grupos de *Staphylococcus* e o grupo *Micrococcus*. No entanto, a única espécie que manteve a nomenclatura inalterada foi *Staphylococcus aureus* (Subgrupo I). Este esquema seria questionado e modificado posteriormente por Pelzer *et al.* (1973), baseado na existência de um grupo intermediário de microorganismos patogênicos, não fermentadores de glicose, cujas características fenotípicas também não eram compatíveis com o gênero *Micrococcus*. Utilizando as reações de fosfatase e acetoina, e a produção de ácido a partir de manitol e lactose, aerobicamente, os autores diferenciaram *Staphylococcus* coagulase negativo em oito grupos distintos, ainda sem a denominação de espécies.

Já em 1975, com a necessidade de identificar CNS de importância médica, Kloos e Schleifer propuseram um esquema simplificado, a partir da escolha de 13 características chave na distinção das espécies do gênero. Neste esquema, foram diferenciados *S. aureus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. epidermidis* e *S. capitis*.

Desde então, alguns autores buscam aumentar o número de espécies identificadas com o menor número de provas possíveis. Utilizando nove provas Iorio *et al.* (2007) identificaram 12 espécies diferentes de *Staphylococcus*. Considerando *S. aureus* como o principal agente da mastite bovina, Brito; Campos; Brito (2002) propuseram um esquema simplificado para identificação deste agente, baseado na triagem pela coagulase e utilizando apenas outros três testes (produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase) e a suscetibilidade à acriflavina.

O esquema de identificação, publicado originalmente por Kloos e Scheleifer, em 1975, aprimorado ao longo do tempo, tem sido substituído em alguns laboratórios de microbiologia clínica por sistemas de identificação comercial como API Staph e ID 32 Staph (BioMérieux), VITEK 2 (BioMerieux), RapID (Remel) e Staph-Zym (Rosco Diagnostica) e sistemas automatizados como BD Phoenix™. Sua utilização pode ser justificada para as espécies estafilocócicas mais frequentemente isoladas, para as quais a precisão de identificação pode chegar a 90%. Porém, frequentemente, esses sistemas

oferecem duas ou mais sugestões para identificação de espécies com níveis de precisão similares (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Segundo Capurro *et al.* (2009), Staph-Zym demonstrou ser inadequado para a identificação de CNS de infecções intramamárias, uma vez que a frequência correta na identificação de isolados foi de apenas 61%, além da necessidade frequente de testes adicionais. Em outro estudo a comparação de dois sistemas (API Staph ID 32 e Staph-Zym) demonstrou baixa acurácia dos testes com identificações corretas de CNS de 41 e 31%, respectivamente. Os autores verificaram, ainda, diferença de sensibilidade conforme as espécies identificadas, tendo encontrado boa sensibilidade para *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. xyloxyus* (SAMPIMON *et al.*, 2009).

Apesar de muito usados na rotina laboratorial, os testes fenotípicos nem sempre apresentam dados satisfatórios, principalmente na identificação a nível de espécie, além de ser uma técnica demorada e laboriosa. A dependência da expressão de atividades metabólicas ou fatores morfológicos da bactéria é visto como um fator limitante desses testes (BECKER *et al.*, 2004; ALEXOPOULOU *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, a espectrometria de massa ou “Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight” (MALDI-TOF) começou a ser utilizada na identificação bacteriana com resultados satisfatórios, comparados aos testes fenotípicos tradicionais. O MALDI-TOF foi capaz de classificar em 13 espécies (*S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. chleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xyloxyus*) 485 (100%) isolados de CNS provenientes de amostras clínicas, enquanto um kit comercial identificou apenas 88,6% delas (DELPORT *et al.*, 2015). Quando comparado com técnicas moleculares como o sequenciamento a partir do gene *tuf*, a identificação de CNS foi considerada, pelos autores, satisfatória para espécies comuns na prática laboratorial, tendo identificado 74,2% (138/186) dos isolados testados contra 98,9% (1846/1864) identificados pelo teste genotípico (BERGERON *et al.*, 2011).

Com a popularização das técnicas de biologia molecular, a classificação de micro-organismos baseada na análise de sequências de ácidos nucleicos tem sido cada vez mais utilizada, sendo consideradas superiores às provas fenotípicas de identificação bacteriana (BECKER *et al.*, 2004; HEIKENS *et al.*, 2005; MELLMANN *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2011). Abordagens como amplificação, hibridização e sequenciamento, podem ser utilizadas para a identificação de estafilococos cultivados.

De modo geral, a amplificação de sequências específicas de genes universais, em regiões conservadas, seguida de sequenciamento permite a diferenciação desses organismos em nível de espécie e, até mesmo, subespécie (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014) e pode ser considerado o padrão ouro para a identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. (GERAGHTY *et al.*, 2013). Os alvos universais utilizados na identificação de CNS compreendem genes ribossômicos como o 16S ou 23S rRNA e as suas sequências espaçadoras, o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gap*), o gene DNA girase (*gyrA*), o gene da superóxido dismutase dependente de manganês (*sodA*), o gene da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*), o gene do fator de alongação TU (*tuf*) e o gene para uma proteína de choque térmico de 60 kDa (*hsp60/GroE*) (BERGERON *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2011; GERAGHTY *et al.*, 2013).

O gene 16S rRNA, altamente conservado em *Staphylococcus* spp., é o alvo mais comumente utilizado na identificação de estafilococos (EDWARDS; KAUFMANN; SAUNDERS, 2001; MELLMANN *et al.*, 2006; FONTES *et al.*, 2013; RUARO *et al.*, 2013), sendo os primeiros 500pb a sequência alvo mais frequentemente utilizada (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008 *apud*. LANGE *et al.*, 2015). A utilização de técnicas como nested-PCR e semi-nested PCR, além da escolha de regiões hipervariáveis, aumentam o poder discriminatório do 16S rRNA (DELBÈS; MONTEL, 2005; HEIKENS *et al.*, 2005; PETROSINO *et al.*, 2009). A partir da amplificação e sequenciamento da região V1-V3 Ruaro (2013) identificou 13 espécies de CNS isolados de leite e queijos. Lange *et al.* (2015), usando o sequenciamento de um fragmento de 536pb identificou 95% dos 213 *Staphylococcus*, isolados de amostras de mastite, com similaridade de 99-100%.

2.3 Resistência à penicilina e meticilina

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming, em 1928, sendo o primeiro antimicrobiano do grupo dos β -lactâmicos usado clinicamente. Esse grupo de antimicrobianos apresenta uma estrutura central comum, na qual está localizado um anel β -lactâmico que dá origem à sua denominação. O alvo dos β -lactâmicos são proteínas (conhecidas como PBPs – *penicillin-binding protein*), que catalisam as atividades de transglicosidase e transpeptidase, necessárias para a biossíntese da parede celular bacteriana. Assim, sua ação bactericida se dá a partir da ligação do antimicrobiano a uma

ou mais proteínas de ligação à penicilina (PBP – sigla em inglês), impedindo a síntese adequada do peptídeoglicano e, conseqüentemente, da parede bacteriana (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Quatro anos após a produção em massa da penicilina, já eram observadas cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano (RAMMELKAMP; MAXON, 1942). Em 1948, mais de 50% das cepas de *S. aureus* que circulavam em hospitais norte-americanos eram resistentes, chegando a um nível de 80% de resistência em 1959. As estimativas atuais da Organização Mundial de Saúde são de que até 90% dos *S. aureus*, isolados de infecções humanas, são resistentes a esta droga. A forma de resistência mais comum à penicilina está relacionada à habilidade que os *Staphylococcus* spp. adquirem de produzir a enzima β -lactamase ou penicilinase, que atua hidrolisando o anel β -lactâmico da penicilina impedindo sua ação sobre a parede celular da bactéria (PEACOCK; PATERSON, 2015).

As β -lactamases são enzimas extracelulares codificadas pelo gene estrutural *blaZ*, que está associado a dois genes regulatórios (*blaI* e *blaR1*). O gene *blaZ* pode estar localizado no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006) podendo, então, ser disseminado horizontalmente por meio de elementos genéticos móveis ou de forma vertical entre as células parentais (MALACHOWA; DELEO, 2010; ALIBAYOV *et al.*, 2014). Quatro tipos de produtos de *blaZ* (A, B, C e D) já foram identificados. Os tipos A, C e D são usualmente localizados em plasmídeos, enquanto o tipo B está inserido no cromossomo bacteriano. A transferência desses genes já foi relatada entre *S. aureus* e outras espécies, indicando que outros estafilococos, como os CNS, podem atuar como reservatórios de genes de resistência para *S. aureus* e vice-versa, principalmente considerando microambientes como a pele, onde residem diversas espécies de estafilococos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006).

O crescente aumento de cepas resistentes à penicilina levou ao desenvolvimento das penicilinas semissintéticas, estáveis à ação das β -lactamases, como a meticilina. A estabilidade desses antimicrobianos está ligada à presença de um grupo acil que impede o ataque do anel β -lactâmico pelas penicilinas. Porém, da mesma forma que ocorreu com a penicilina, não demorou muito para que surgissem cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; PEACOCK; PATERSON, 2015).

A resistência à meticilina é baseada na expressão de uma proteína alternativa de ligação à penicilina, a PBP2a. A baixa afinidade de ligação da PBP2a à meticilina

possibilita a síntese da parede celular mesmo na presença de β -lactamases, conferindo-lhes resistência à maioria os β -lactâmicos (PEACOCK; PATERSON, 2015).

O subtipo de PBP expresso por estafilococos resistentes à meticilina é codificado pelo gene *mecA*. Este gene faz parte de um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) que inclui, além do *mecA*, os genes de regulação da expressão dos genes (*mecI* e *mecRI*) e, ainda, genes específicos denominados de cassete cromossômico de recombinação (*ccr*) que codificam a enzima recombinase, responsável pelo movimento de excisão e integração do SCC*mec* (PEACOCK; PATERSON, 2015).

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 *Micrococcus caseolyticus* por Baba *et al.* (2009). Becker *et al.* (2014), chamam atenção que *M. caseolyticus* poderia atuar como reservatório do gene *mecB* e, pelo fato desses genes poderem estar localizados em plasmídeos poderiam ser transferidos para estafilococos. 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 (TSUBAKISHITA *et al.*, 2010; HARRISON *et al.*, 2013; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2015). A partir de um estudo de meta-análise de artigos publicados até 2015, Diaz *et al.* (2016) estimaram a prevalência do gene *mecC* em *S. aureus*. A estimativa em isolados de humanos foi 0,004%, enquanto para isolados de animais foi de 0,10%, ficando a prevalência geral estimada em 0,009% (95% CI= 0,005-0,013). Com isso, a prevalência do gene foi considerada extremamente baixa pelos autores.

Desde os primeiros relatos de resistência à meticilina, no início de 1960, *S. aureus* resistentes à meticilina foram nomeados como MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). A partir daí se disseminaram sob forma de surtos esporádicos, mas algumas vezes graves, de infecções hospitalares. A partir dos anos oitenta, tornaram-se mundialmente endêmicos em ambientes hospitalares (AYLIFEE, 1997; PEACOCK; PATERSON, 2015). Podem ser distinguidos fenotipicamente de acordo com as características de infecção e genotipicamente por técnicas moleculares (SCHULZ *et al.*, 2012). HA-MRSA (*Hospital acquired MRSA*) compreendem micro-organismos envolvidos em infecções hospitalares, CA-MRSA (*Community acquired MRSA*) isolados provenientes de infecções comunitárias, e LA-MRSA (*Livestock associated MRSA*)

envolvidos em infecções onde há contato estreito entre humanos e animais de produção (GRAVELAND *et al.*, 2011).

A resistência à meticilina já foi relatada em outras espécies de *Staphylococcus* spp. como *S. pseudintermedius* (MRSP), considerado como um problema de saúde animal devido à dificuldade no tratamento das infecções por MRSP (DUIJKEREN *et al.*, 2011), e os *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes à meticilina (MR-CoNS), considerados um possível reservatório de genes de resistência como os do complexo SCCmec (TULINSKI *et al.*, 2012).

Desde então, a busca dessas cepas resistentes tem sido realizada não só em *S. aureus*, mas em outras espécies. Outra questão levantada, são as diferentes fontes dessas bactérias e a proximidade entre humanos e animais, já que *Staphylococcus* spp. são ubíquos em ambos, além de estarem presentes em muitos nichos na natureza.

Gandolfi-Decristophoris *et al.* (2013), analisando conteúdo de suabe nasal provenientes de cães (256) e gatos (277) saudáveis de quatro regiões da Suíça, utilizando MALDI-TOF, identificaram 22 espécies de CNS em cães e 24 espécies em gatos, sendo que o gene *mecA* esteve presente em 6% dos isolados de cães e 3% dos isolados de gatos. Ruzauskas *et al.* (2015), analisando amostras coletadas de cães com várias condições clínicas (dermatites, otites, infecções de feridas, infecções gastrointestinais e respiratórias, piometrites, metrites e partos prematuros) na Lituânia, observou uma prevalência de 86,5% de CNS, sendo 4,5% desses isolados resistentes à meticilina e positivos para a presença do gene *mecA*, o gene *mecC* não foi encontrado.

Considerando os LA-MRSA, Zhang; Agidi; LeJeune (2009) observaram 65% de *mecA* positivos em amostras de animais de produção (bovino, ovelha, cabra, porco, pato, frango, ganso, cavalo, peru); as principais espécies isoladas foram *S. lentus*, *S. sciuri* e *S. xylosus*. Os autores chamam atenção para a diversidade clonal SCCmec nesses isolados e sugerem que, tanto a transmissão clonal de SCCmec resistente à meticilina como a transferência horizontal de SCCmec, ocorrem no ambiente de produção animal. Em criações de suínos dos Países Baixos, Tulinski *et al.* (2012) identificaram 44 cepas (CNS e *S. aureus*) positivas para *mecA* em dez espécies distintas de *Staphylococcus* spp. apresentando, mais uma vez, heterogeneidade de SCCmec. O tipo SCCmec V foi compartilhado entre *S. aureus* e *S. epidermidis* e IVc esteve presente em 4 MR-CoNS, indicando a possibilidade de transferência interespecífica de elementos SCCmec em granjas de suínos.

A presença de cepas resistentes em animais de produção sugere a possibilidade de permanência dessas estirpes também em alimentos de origem animal. Podkowik; Bystron; Bania (2012), analisando produtos cárneos (bovino e suíno e frango) prontos para o consumo, observou a resistência aos β -lactâmicos, sendo que 96% dos *S. aureus* e 92% dos CNS isolados carregavam o gene *blaZ*. O gene *mecA* não foi identificado em nenhum *S. aureus* isolados; no entanto, 37% dos CNS apresentaram *mecA*. O gene *blaZ* também esteve presente em 72% dos isolados de *S. aureus* identificados por Baumgartner; Niederhauser; Johler (2014) ao analisarem 244 alimentos prontos para o consumo e a frequência de MRSA foi de apenas 1%. Na Polônia, a análise de produtos cárneos e queijos apresentou 41,3% de MR-CoNS (queijo, carne curada e peixe) e 4% de MR-CoNS (carnes suína, de frango e salame) em dois estudos independentes (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2015; FIJAKOWISKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016). Esses resultados demonstram a alta frequência do gene que confere resistência à penicilina (*blaZ*) em CNS isolados de alimentos, além das diferenças entre os isolados, conforme a matriz analisada no que se refere a resistência à meticilina.

A frequência de MRSA reportada em leite de conjunto refrigerado nos Estados Unidos é considerada baixa, sendo apenas de 0,3% (CICCONI-HOGAN *et al.*, 2014), apesar da alta prevalência de *Staphylococcus aureus* encontrado no leite. A prevalência de MR-CoNS variou de 2% em produção orgânica de leite a 5% em produção convencional (CICCONI-HOGAN *et al.*, 2014). *Staphylococcus* spp. coagulase negativa isolados de leite bovino entre 2001 e 2004 na Holanda apresentaram 60% (102/170) de cepas positivas para *blaZ* e 0,04% carregavam o gene *mecA* (SAMPIMON *et al.*, 2011). MR-CoNS foram identificados em 6,5% de isolados de mastite bovina, enquanto *blaZ* esteve presente em 20,4% das cepas analisadas entre 2010 e 2013 na Argentina (SREDNIK *et al.*, 2015).

Infecções por MRSA são, sem dúvida, um problema enfrentado no mundo todo. A frequência de CNSs abrigando genes de múltipla resistência, algumas vezes maior que de *S. aureus*, em alimentos de origem animal chama atenção para a importância dos animais e seus produtos como reservatórios de cepas resistentes a antimicrobianos, bem como, destas cepas como reservatórios de genes de resistência, contribuindo para a evolução da resistência em espécies estafilocócicas patogênicas.

2.4 Enterotoxinas clássicas

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 enterotoxinas estafilocócicas (SE) 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 (MARRACK; KAPPLER, 1990; HARRYS *et al.*, 1993; BALABAN; RASOOLY, 2000).

Argudín; Mendoza; Rodicio (2010) descreveram 22 enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, este universo já era 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 SE (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e SEI (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU₂ e SEIV).

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 primatas: 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 estirpe 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; HORN; HUDSON, 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 a 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 na expressão em temperatura de 8°C. Segundo Hennekinne; Buyser; Dragacci (2012), as temperaturas mínimas para a produção de toxinas podem variar entre 15 e 38°C. Embora a produção das enterotoxinas não seja totalmente inibida em baixas temperaturas, conforme relatados nos estudos, trazem a luz a possibilidade de manter um alimento seguro a partir da manutenção da cadeia do frio.

Além de fatores intrínsecos e extrínsecos já mencionados, a produção de SE também pode estar relacionada com a concentração bacteriana. Segundo Paulin; Horn; Hudson (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 micro-organismos 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).

Conforme descrito por Argudín; Mendoza; Rodicio (2010), todos 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). A maioria destes, são elementos genéticos móveis e sua disseminação entre os isolados de *Staphylococcus* spp. pode modificar sua capacidade de causar doença e contribuir para a sua evolução. Na tabela 2 está apresentada a localização dos genes codificadores das enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* spp.

Tabela 2 – 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: Novick; Schlievert; Ruzin, 2001 (adaptada).

Embora *S. aureus* seja o principal e mais estudado representante do gênero quanto à presença e expressão de enterotoxinas e dos demais fatores de virulência, as suspeitas de que outros estafilococos possam também carrear tal característica é considerada por muitos grupos de pesquisa, principalmente com o aumento da significância clínica de algumas cepas de CNSs (OTTO, 2009; PIETTI; VERSCHRAEGEN, 2009; MAZZARIOL *et al.*, 2012; ÜNAL; ÇINAR, 2012).

Quando testes sorológicos e ensaios em animais eram a única forma direta de demonstrar a produção de toxinas em alimentos ou culturas, Genigeorgis (1989) já relatava, em seu artigo de revisão, a produção de enterotoxinas por CNS como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. luteus*, *S. conhii*, *S. xylosus*. Porém, não há consenso entre os pesquisadores, uma vez que muitas dessas espécies são consideradas microbiota de ação benéfica sendo utilizadas em processos de fermentação de carnes e queijos (IRLINGER, 2008); ou os genes codificadores de enterotoxinas não são amplificados em todos os estudos (ROSEC; GIGAUD, 2002). Segundo Irlinger, até 2008 nenhuma espécie de estafilococos coagulase negativa isolada de leite ou produtos lácteos teria sido envolvida em caso de intoxicação alimentar ou patologia humana após a ingestão de produtos lácteos. No entanto, em 2002 foi relatado por Carmo *et al.* (2002) um surto que acometeu 328 indivíduos, em Minas Gerais, no qual a fonte comum de contaminação foi leite cru com presença de CNS em contagens superiores a 10^8 e a produção de SEC e SED.

Apesar dos genes codificadores de enterotoxinas estarem presentes em muitas cepas isoladas de alimentos (FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016), nem sempre a expressão da toxina é confirmada. Em estudo realizado com bactérias de 16 surtos alimentares no Brasil, a amplificação do gene *sea* não garantiu a expressão da

enterotoxina, enquanto para SEB a expressão ocorreu (VERAS *et al.*, 2008). Rall *et al.* (2010) analisando amostras de queijos brasileiros, isolaram oito espécies diferentes de CNS; dessas, cinco carregavam genes codificadores de SEs, no entanto a resposta para produção de enterotoxinas pelo método de ensaio de aglutinação de látex passivo reverso (RPLA) foi negativa. O contrário foi observado por Nunes *et al.* (2016), das 10 cepas de CNS identificadas em queijo Minas frescal, nove foram capazes de produzir enterotoxinas. Buscando entender a dinâmica das bactérias enterotoxigênicas nos alimentos, Oliveira *et al.* (2010) inocularam 10 cepas toxigênicas em diferentes matrizes alimentares. Das 10 bactérias inoculadas somente *S. chromogenes* foi capaz de produzir SE nos alimentos, nas condições do estudo. Os autores chamam atenção, também, para a importância da microbiota competidora.

A maioria das informações existentes quanto à determinação de toxinas em alimentos são referentes, quase que exclusivamente, a *S. aureus* (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; ROLA *et al.*, 2015). Esses dados revelam que dentre as SEs, a enterotoxina A é a mais frequentemente relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar (BALABAN; RASOOLY, 2000; VERNIZY-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. SED 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).

A identificação da espécie bacteriana em conjunto com a determinação do antígeno pode trazer informações importantes quanto a fonte de contaminação do alimento. Assim como algumas espécies de estafilococos são mais frequentes em alguns nichos, as enterotoxinas podem ser associadas a espécies específicas. Por exemplo, SEA e SEB são frequentemente associadas com contaminação humana, enquanto SEC e SED com contaminação animal (bovino e suíno). Determinar o tipo de SE pode auxiliar na investigação epidemiológica bem como no controle de novas contaminações uma vez que pode indicar a provável fonte de contaminação (CHAVES, 2012).

2.5 Intoxicação alimentar estafilocócica

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças alimentares mais comuns no mundo (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012). Em 2014, nos Estados Unidos *S. aureus* foi relacionado a 17 surtos alimentares com mais de 500 doentes e 10 hospitalizações, neste país o agente foi o quinto entre os agentes bacterianos reportados em surtos naquele ano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Dos surtos notificados entre 1993 e 2010, em 20 países da América Latina e Caribe, *S. aureus* e *Salmonella* foram os patógenos mais prevalentes, presentes em 946 casos cada um (PIRES *et al.*, 2011). No Brasil, dentre os agentes bacterianos mais frequentes em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) *S. aureus* é o terceiro agente mais incriminado em surtos, abaixo apenas das gastroenterites causadas por *Escherichia coli* e *Salmonella* (BRASIL, 2016). No Rio Grande do Sul, o agente foi o segundo mais frequente (17,9%) em surtos analisados entre os anos de 2004 e 2012 (FISCHER, 2013), frequência semelhante à encontrada nos 163 surtos investigados entre 2003-2011 na cidade de Porto Alegre, quando *S. aureus* foi confirmado em 14% das amostras de alimentos analisadas (NASCIMENTO, 2013).

A doença alimentar causada por *Staphylococcus spp.* é resultante da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento, produzidas, principalmente por *S. aureus*. O período de incubação e severidade dos sintomas observados dependem da quantidade de enterotoxinas ingerida e a suscetibilidade do indivíduo (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Os principais sintomas são náusea, vômito, dores de cabeça, dores abdominais, que podem se manifestar entre 30 minutos a oito horas após a ingestão do alimento contaminado. A doença geralmente é autolimitante tendo sua resolução em 24-48 horas, sem a necessidade de acesso aos sistemas de saúde, porém, agravos podem ocorrer quando os envolvidos são crianças, idosos, ou pacientes imunocomprometidos (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Segundo Borges (2008), o caráter do curso da doença (24-48 horas sem necessidade de hospitalização) é responsável pela subnotificação desta intoxicação.

Além da contaminação do alimento por cepa enterotoxigênica, alguns fatores são necessários para que a bactéria expresse a toxina em quantidade suficiente para que o alimento seja considerado um risco (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012). Fatores como temperatura, pH e atividade de água diferem e precisam ser atendidos para esta expressão, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Fatores que afetam o crescimento bacteriano e a produção de enterotoxinas por *S. aureus*.

Parâmetro	Desenvolvimento do micro-organismo		Produção de enterotoxina	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Temperatura °C	37	7-48	37-45	10-45
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Atividade de água	0,98	0,83-0,99 ^I	0,98	0,85-0,99 ^{II}

(I) aeróbico (anaeróbico 0,90-0,99); (II) aeróbico (anaeróbico 0,92-0,99)

Fonte: Hennekinne; Buysse; Dragacci (2012); adaptada.

Staphylococcus aureus é o principal representante do gênero isolado de fontes alimentares incriminadas em surtos; no entanto, outras espécies já foram identificadas em alimentos associados a surtos (CARMO *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2008). *Staphylococcus* spp. coagulase negativa foram isolados de leite cru associado a um surto em Minas Gerais, envolvendo 328 indivíduos (CARMO *et al.*, 2002). Veras *et al.* (2008), analisando *Staphylococcus* spp. recuperados de alimentos provenientes a 16 surtos, em Minas Gerais, confirmou a capacidade de CNS para expressar superantígenos. Em estudo avaliando a qualidade sanitária de serviços de alimentação no Sul do Brasil, dos 121 isolados bacterianos, 105 eram CNS e 70% destes carregavam genes para enterotoxinas (MELLO *et al.*, 2014). Embora a capacidade enterotoxigênica de CNS tenha sido demonstrada em diversos estudos, a pesquisa dessas bactérias em alimentos associados a surtos de intoxicação alimentar ainda não é preconizada pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

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). Nos Estados Unidos, entre 1993 e 2006, 121 surtos cuja fonte eram produtos lácteos foram reportados, em 54% dos surtos o produto referido foi queijo (LANGER *et al.*, 2012). 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; MAFFEI; CATANOZI, 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.

O consumo de queijo no Rio Grande do Sul, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010) foi, em 2008-2009, de 3,213 kg/per capita. Os hábitos alimentares, adquiridos pelos gaúchos, devido a influência das colonizações portuguesa, italiana e alemã, fazem com que o queijo, principalmente o “colonial”, seja consumido regularmente pelas famílias.

O queijo colonial, tradicionalmente consumido no Rio Grande do Sul, não possui regulamento técnico padronizado e os estudos quanto a sua qualidade microbiológica são escassos. Segundo Fava *et al.* (2012), o queijo tipo colonial oferecido em feiras agropecuárias pode representar risco à segurança alimentar. Dos 12 queijos analisados adquiridos em uma feira no Município de Porto Alegre, cinco apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva acima de 10^3 UFC.g⁻¹, considerados fora dos padrões microbiológicos para a matriz estudada. O perigo no consumo de queijos também foi sugerido por Zaffari; Mello; Costa (2007), ao analisarem queijos comercializados em bancas localizadas em estradas gaúchas. Neste estudo não foram pesquisados estafilococos; no entanto, a presença de *Listeria* spp. e contagens elevadas de coliformes termotolerantes alertam para a baixa qualidade microbiológica do produto. Da mesma forma, Roos *et al.* (2005), observaram altos índices de contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em queijo colonial comercializado na cidade de Três Passos/RS; neste estudo, foram analisadas 25 amostras de queijos provenientes de estabelecimentos não inspecionados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

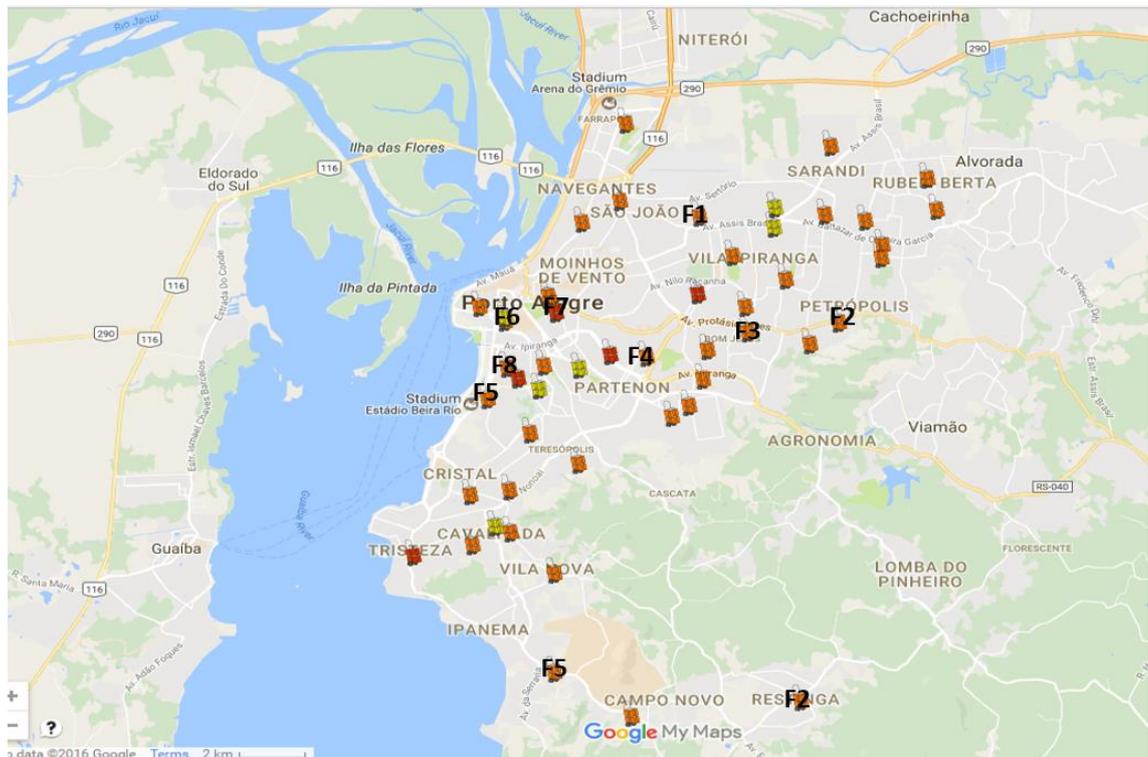
3.1 Delineamento do estudo

A identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (CNS) foi conduzida paralelamente a um estudo transversal que visava avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em queijo colonial inspecionado comercializado em Porto Alegre. A coleta de amostras foi intencional tendo como critérios: a comercialização da matriz em estudo (Queijo Colonial) que ocorre, principalmente, em feiras e Mercado Público; e a disponibilidade do produto nos locais de venda.

O tamanho da amostra foi calculado para obter uma probabilidade de 99% de isolamento de *L. monocytogenes* em pelo menos um queijo, assumindo que o número de bactérias tenha distribuição de Poisson (HOELZER; POUILLOT, 2013). Os parâmetros utilizados para o cálculo foram: 0,001 UFC/g (λ); 25 gramas da matriz; sensibilidade do teste microbiológico de 90%. A partir disso, determinou-se a necessidade de 205 unidades analíticas para atingir 99% de probabilidade de detecção de ao menos uma amostra positiva.

Para garantir a representatividade da amostra, foi primeiramente determinado o perfil das bancas que comercializavam queijo colonial nas Feiras Modelo (F) e no Mercado Público (M). Observou-se que no universo de 38 Feiras Modelo, havia oito grupos de fornecedores, os quais contavam com bancas de venda em feiras distribuídas nas diversas regiões da cidade de Porto Alegre, conforme ilustrado na Figura 1. No Mercado Público, sete bancas comercializavam queijo colonial. A partir disso, estabeleceu-se que as bancas desses 15 grupos de comerciantes seriam os locais de coleta de amostras. Foram realizadas visitas a cada uma das bancas, sendo adquirida uma amostra de cada uma das marcas de queijo colonial inspecionado, disponível no ponto de venda. Os grupos de fornecedores F4, F5 e F6, representados por mais de uma banca na mesma feira, tiveram todas as bancas com amostras coletadas, sendo consideradas uma única banca. Para atingir o número total de amostras necessárias, as coletas foram distribuídas no período de quinze semanas (novembro de 2014 a maio de 2015), intercalando-se os pontos de coleta para permitir amostrar lotes diferentes das marcas de queijo, conforme demonstrado na Tabela 4.

Figura 1 – Distribuição das Feiras Modelo de Porto Alegre e os locais onde foram realizadas as coletas de amostras (F1-F8).



Fonte: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/smic/default.php?p_secao=204

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)	S11								Total de amostras por local
		S1	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.

Cada amostra foi composta de uma fração mínima de 300g da matriz, sendo a mesma adquirida sem que os comerciantes tomassem ciência do objetivo da compra, tendo-se, desta forma, a análise de um produto semelhante ao que chega à mesa do consumidor. Nesse momento, era observado se o queijo estava armazenado em refrigeração ou à temperatura ambiente. Tal observação foi realizada visualmente, considerando-se refrigerado o produto exposto em equipamento com capacidade de resfriamento, não sendo aferida a temperatura do mesmo no momento da aquisição. A fração adquirida era transportada na embalagem na qual havia sido acondicionada no ato da venda e levada ao laboratório, onde era mantida refrigerada até a realização da análise.

3.2 Processamento laboratorial das amostras de queijo

A unidade analítica (25g de queijo) foi coletada 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 uma embalagem plástica estéril até que se completassem 25g. Entre cada amostra processada, era realizada a higienização da capela e da balança com etanol 70%, bem como a troca de facas, pinças e colheres estéreis.

A unidade analítica foi submetida ao protocolo ISO 6888-1:1999 para isolamento de *Staphylococcus* spp. Vinte e cinco gramas de queijo foram diluídas em 225mL de peptona bacteriológica a 0,1%, homogeneizadas em Stomacher® por 60 segundos, obtendo-se assim, a primeira diluição (10^{-1}). A partir desta diluição foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 1mL para 9mL de peptona bacteriológica 0,1% até a diluição 10^{-3} . Posteriormente, da primeira diluição foram semeadas três alíquotas (0,3mL; 0,3mL; 0,4mL) em três placas (90mm) contendo ágar *Baird-Parker* - BP (Oxoid). Das demais diluições (10^{-2} e 10^{-3}) foram semeadas alíquotas de 0,1mL em placas (90 mm) contendo ágar BP. As amostras semeadas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, selecionaram-se placas que continham entre 15 e 150 unidades formadoras de colônias (UFC) procedendo-se a contagem de colônias típicas (colônias circulares, pretas ou cinza escuras, convexas, lisas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca) e atípicas (colônias morfologicamente semelhantes às típicas, porém, sem a presença de halos).

A enumeração de colônias típicas e atípicas foi realizada multiplicando-se o número de colônias contadas pela diluição utilizada para a contagem, considerando, ainda, o volume da alíquota semeada (1mL ou 0,1mL). O resultado foi expresso em colônias típicas e atípicas em 1g de queijo.

3.3 Triagem de cocos Gram positivos coagulase-negativos

Cinco colônias de cada tipo (típicas e atípicas); ou a totalidade das colônias, quando o número fosse inferior a cinco, foram semeadas em Ágar Triptose de Soja (TSA, Oxoid). Após incubação a 37°C por 24 horas, colônias individuais foram submetidas à coloração de Gram e à prova da catalase (QUINN *et al.*, 2011), as quais serviram de triagem.

Colônias que apresentaram morfologia de cocos Gram positivos e eram catalase positivas foram transferidas para Caldo Infusão Cérebro e Coração – (BHI, Himedia).

Após incubação a 37°C por 24 h, foi realizado o teste da coagulase em tubo (QUINN *et al.*, 2011) no qual uma alíquota de 100 µL do caldo com crescimento foi transferido para um tubo estéril contendo 300 µL de plasma de coelho. A formação de coágulo foi avaliada a cada trinta minutos por até quatro horas de incubação a 37°C e, novamente, após 24 horas. Foram considerados *Staphylococcus* coagulase-positivos os isolados que apresentaram a formação de coágulo organizado no tempo de observação. Isolados que não apresentaram esse perfil foram considerados como sendo cocos Gram-positivos não coaguladores de plasma de coelho.

3.4. Identificação fenotípica de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Os isolados classificados como cocos Gram-positivos coagulase negativos foram submetidos a testes fenotípicos para identificação do gênero *Staphylococcus*. Para tanto, cada isolado foi submetido aos testes de oxidação-fermentação (OF), suscetibilidade a antimicrobianos (bacitracina e furazolidona) e à lisostafina. Em todos os testes as cepas *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) foram utilizadas como controle positivo e negativo aos testes, respectivamente. Os testes fenotípicos foram conduzidos como descrito por Quinn *et al.*, (2011).

3.4.1 Teste de oxidação e fermentação (OF)

Dois tubos de ágar OF (Difco™) acrescido de 1% de glicose, foram inoculados com cada isolado, sendo um deles coberto com uma camada de óleo mineral para criar o ambiente com baixa concentração de oxigênio. O teste foi observado, diariamente, por até 10 dias de incubação a 36±1°C, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram mudança de coloração do meio para amarelo, indicando a acidificação do mesmo a partir da utilização da glicose. São considerados fermentadores de glicose os isolados que apresentavam acidificação da glicose no tubo com a presença de óleo ou em ambos os tubos.

3.4.2 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade à bacitracina e furazolidona pelo método de disco difusão (CLINICAL AND LABORATORY

STANDARDS INSTITUTE, 2016). Colônias com 24 horas de cultivo em TSA foram transferidas para solução salina 0,85% até uma concentração de 0,5 na escala *McFarland* e semeadas em placas de ágar *Muller-Hinton* (Oxoid). Discos de bacitracina (0,04UI) e furazolidona (100mcg) foram depositados na superfície das placas que foram incubadas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 18-24 horas. Após, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de régua e avaliados de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Interpretação dos halos de inibição de bacitracina e furazolidona em teste de disco-difusão para identificação de gêneros da família *Staphylococcaceae*.

	Diâmetro do halo de inibição	
	Resistente	Suscetível
Bacitracina	< 9mm	>10mm
Furazolidona	< 15mm	>15mm

Fonte: HÉBERT *et al.* (1988)

3.4.3 Teste de suscetibilidade à lisostafina

Colônias com 24 horas de crescimento em TSA foram transferidas para dois tubos, cada um contendo 1 mL de solução salina 0,85% até atingir a concentração 2 da escala de *MacFarland*. Em um dos tubos foi acrescido 10 μL de uma solução de lisostafina (Sigma-Aldrich®) na concentração 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ambos os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por duas horas. Foram utilizados *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. aureus* (ATCC 25923) como controles positivos (susceptíveis) e *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) como controle negativo (resistente). A lise bacteriana foi avaliada comparando-se os dois tubos - com e sem lisostafina - após a incubação, sendo considerados os isolados que apresentaram turvação somente no tubo com salina 0,85% como susceptíveis à lisostafina.

Isolados que apresentaram o seguinte fenótipo: fermentador de glicose (OF), resistente à bacitracina, suscetível à furazolidona e à lisostafina foram classificados como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

3.5 Identificação genotípica de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Isolados identificados fenotipicamente como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram submetidos à identificação genotípica. Foram excluídos isolados em duplicata que fossem provenientes da mesma amostra de queijo e cujas características morfológicas, de perfis bioquímicos fossem semelhantes. A identificação genotípica de gênero e espécie dos isolados foi realizada a partir da sequência de nucleotídeos da região V1-V2 do gene 16S rRNA.

3.5.1 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.

3.5.2 Amplificação da região V1-V2 do gene 16S rRNA

Foi aplicado o protocolo de semi-nested PCR descrito por Edwards, Kaufmann e Saunders (2001) para a amplificação da região V1-V2 do gene 16S rRNA. Para cada reação foram utilizados *S. epidermidis* (ATCC 12228) e água ultrapura estéril como controles positivo e negativo das reações, respectivamente.

Primeiramente, o fragmento total do gene 16S rRNA (1500 pb) foi amplificado, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores EpsilonF (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1510R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (EDWARDS; KAUFMANN; SAUNDERS, 2001). Cada reação de PCR foi realizada para um volume final de 100µL, sendo deste volume 79,6µL de água ultrapura, 2,5µL de cada primer (15pmol/µL), 5µL de tampão 10X PCR Rxn Buffer (Invitrogen®), 3 µL MgCl₂ (50mM), 2 µL dNTP's mix (10mM), 0,4 µL Taq Polimerase 5 U/µL (Invitrogen®) e 5µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® 96-Well

Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com as seguintes condições: 3 min a 94°C; seguido de 30 ciclos de 45s a 94°C, 30s a 55°C e 90s a 72°C; e 10 min a 72°C. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, 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).

Os produtos obtidos na primeira amplificação foram submetidos a uma segunda reação na qual utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores EpsiloF (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 320R (5'-TTGACCGTGTCTCAGTTCCA-3') (EDWARDS; KAUFMANN; SAUNDERS, 2001). A reação com volume final de 100µL foi constituída de 68,8 µL de água ultrapura, 10 µL de tampão 10X PCR Rxn Buffer (Invitrogen®), 3µL MgCl₂ (50mM), 8µL dNTP's mix (2,5mM), 2,5µL de cada primer (10pmol/µL), 0,2µL Taq Polimerase (Invitrogen®) e 5µL do amplicon proveniente da primeira reação. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (AppliedBiosystems™) com as seguintes condições: 5 min a 95°C; seguido de 30 ciclos (60s a 95°C, 60s a 55°C, 60s a 72°C); e 10 min a 72°C. O produto esperado da segunda reação apresentava tamanho de 320pb e foram visualizados em gel de agarose 1%, adicionados de Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia) e visualizados sob iluminação ultravioleta (Kasvi®) comparando-se os fragmentos com marcador de massa molecular de 100pb GelPilot (Qiagen)

3.5.3 Sequenciamento dos fragmentos da região V1-V2 do 16S rRNA

O produto obtido da reação de semi-nested 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 segunda reação de PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol do primer EpsilonF (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 320R (5' – TTGACCGTGTCTCAGTTCCA - 3') 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. Após marcadas as amostras foram purificadas por precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

A identificação das espécies foi realizada por comparação da sequência da região V1-V2 do gene 16S rRNA com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para tanto, as sequências referentes a cada isolado foram analisadas no software Chromas 2.6, desprezando as bases que apresentaram score Phred menor que 30. Após a construção da fita consenso, utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor, a sequência foi submetida ao banco de dados *online* do NCBI, utilizando a ferramenta Nucleotide Blast, sendo considerada a classificação que apresentou percentual de identidade maior ou igual a 99 como a correspondente ao isolado testado.

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

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

3.7 Pesquisa de resistência à penicilina e meticilina

3.7.1 Pesquisa do gene *blaZ*

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos foi investigada a partir da amplificação do fragmento do gene *blaZ* de 377 pb utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG-3') e (5'-TAAGAGATTTGCCTATGCTT-3'), descritos por Olsen; Christensen; Aarestrup, (2006). A reação era constituída de 18,8 μ L 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 1µL de DNA em uma reação final de 25µL. Seguindo 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. A cepa referência *S. aureus* (ATCC 29213) foi utilizada como controle positivo da reação e água ultrapura estéril como controle negativo. 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®).

3.7.2 Resistência à meticilina

O teste de triagem para resistência à meticilina foi realizado pelo método de disco difusão em ágar, utilizando discos de cefoxitina (30µg), de acordo com recomendação do CLSI – M100S (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 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 cefoxitin 30µg (Oxoid) foram depositados na superfície do ágar e as placas incubadas a 34±1°C por 18-24 horas. Para a interpretação dos halos de inibição medidos foram considerados ≤ 24 mm como resistência à meticilina. Os isolados com fenótipo de resistência foram submetidos à pesquisa do gene *mecA*.

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 25µL foi constituída de 17,8µL de água ultra pura, 2,5µL de tampão 10X contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM KCl (Ludwig-Biotec), 0,5µL MgCl₂ (50mM), 2,0µL dNTP's mix (10mM), 0,5µL de cada primer (20pmol/µL), 0,2µL Taq Polimerase (Ludwig Biotec) e 1µL de DNA. Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa de referência *S. aureus* (ATCC 43300). Como controles negativos foram utilizados *S. aureus* (ATCC 25923) e água ultrapura estéril. Para a reação foi utilizado o 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®).

4 RESULTADOS

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 banca. 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.

Banca	Amostras	Sem de refrigeração	Refrigerado
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%)
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%)
Total	205	21	184
Geral	(100%)	(10,2%)	(89,7%)

O total de 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) 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 quinze grupos inseridos no 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	Grupos comerciantes														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						3			12
E	3							4					1			8
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

As amostras de queijo analisadas apresentaram colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase-positivos em ágar Baird-Parker que variaram de $<1 \text{ UFC.g}^{-1}$ até $2,5 \times 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$ (Tabela 10). Todas as amostras analisadas da marca B apresentaram contagem $<1 \text{ UFC.g}^{-1}$, enquanto as amostras da marca D apresentaram a maior mediana de colônias típicas ($2,6 \times 10^5$). As colônias atípicas variaram de $2,0 \times 10^1$ a $6,6 \times 10^6$. As maiores medianas de colônias atípicas de *Staphylococcus* coagulase-positivos em ágar Baird-Parker foram encontradas nas marcas D e F ($2,4 \times 10^6$), enquanto a marca B apresentou a menor mediana ($1,5 \times 10^3$). Entre as colônias atípicas, foram identificados cocos Gram positivos catalase positiva, cocos Gram positivos catalase negativa e bacilos Gram negativos.

Tabela 10 – Mediana, número mínimo e máximo de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos em ágar Baird-Parker observados em amostras de 17 marcas de queijo colonial.

Marca	Nº Amostras	Colônias Típicas (UFC.g ⁻¹)			Colônias Atípicas (UFC.g ⁻¹)		
		Mediana	Mínima	Máxima	Mediana	Mínima	Máxima
A	1*	ND	ND		ND	ND	ND
B	12	<1	<1	<1	1,5x10 ³	2,0x10 ¹	3,0x10 ⁵
C	39	<1	<1	3,0x10 ⁴	6,4x10 ⁵	1,9x10 ³	4,0x10 ⁶
D	12	2,6x10 ⁵	<1	2,5x10 ⁶	2,4x10 ⁶	6,5x10 ⁵	2,6x10 ⁶
E	8	<1	<1	1,4x10 ⁵	1,8x10 ⁵	7,7x10 ³	2,4x10 ⁶
F	37	1,5x10 ⁴	<1	2,2x10 ⁵	2,4x10 ⁶	7,0x10 ⁴	6,6x10 ⁶
G	4	<1	<1	2,0x10 ³	5,3x10 ⁵	7,0x10 ⁴	1,1x10 ⁶
H	15	2,1x10 ⁴	<1	5,0x10 ⁴	8,0x10 ⁵	9,0x10 ³	3,9x10 ⁶
I	2	ND	<1	1,0x10 ²	ND	1,3x10 ⁵	4,0x10 ⁵
J	12	<1	<1	2,0x10 ⁴	2,9x10 ⁵	5,0x10 ⁴	2,7x10 ⁶
K	2	ND	5,0x10 ⁴	7,0x10 ⁴	ND	7,0x10 ⁵	5,4x10 ⁶
L	4	<1	<1	5,0x10 ³	4,0x10 ⁵	4,5x10 ⁴	5,2x10 ⁶
M	9	<1	<1	1,0x10 ³	1,7x10 ⁵	3,4x10 ⁴	2,8x10 ⁶
N	3	3,0x10 ²	<1	3,8x10 ⁴	1,7x10 ⁵	9,8x10 ³	4,1x10 ⁵
O	7	<1	<1	3,0x10 ³	1,2x10 ⁵	4,0x10 ⁴	8,4x10 ⁵
P	29	1,0x10 ²	<1	3,0x10 ⁴	4,0x10 ⁵	1,5x10 ³	4,2x10 ⁶
Q	9	2,0x10 ³	<1	5,0x10 ⁴	5,4x10 ⁵	2,2x10 ⁴	2,4x10 ⁶

* Colônias típicas 6x10³; colônias atípicas 3,6x10⁶

ND: não determinado

Entre as colônias atípicas analisadas, 179 apresentaram-se como cocos Gram positivos, catalase positiva e coagulase negativa. Essas colônias foram provenientes de 110 amostras de queijos pertencentes a 16 marcas distintas.

Realizados os testes fenotípicos para diferenciação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, 59 queijos apresentaram ao menos um isolado com características compatíveis com o gênero *Staphylococcus*.

Por meio do sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S rRNA, foram identificadas 13 espécies bacterianas distintas, conforme apresentado na Tabela 11. O micro-organismo mais frequente foi *Micrococcus caseolyticus* (40%) e 35 cepas (60%)

foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, sendo *S. equorum* e *S. vitulinus* as espécies predominantes. No APÊNDICE A estão listadas as 59 espécies identificadas por sequenciamento, com sua origem, enumeração de colônias típicas e atípicas e fatores de virulência analisados.

Tabela 11 – Identificação de 59 cepas bacterianas originadas de amostras de queijo colonial, por testes fenotípicos e sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S rRNA.

Espécie	Número de cepas	(%) do Total
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	24	40
<i>S. equorum</i>	10	16,9
<i>S. vitulinus</i>	6	10,2
<i>S. hyicus</i>	4	6,8
<i>S. saprophyticus</i>	4	6,8
<i>S. epidermidis</i>	3	5,1
<i>S. carnosus</i>	1	1,7
<i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	1	1,7
<i>S. capitis</i>	1	1,7
<i>S. chromogenes</i>	1	1,7
<i>S. fleurettii</i>	1	1,7
<i>S. haemolyticus</i>	1	1,7
<i>S. succinus subsp. casei</i>	1	1,7
<i>S. warneri</i>	1	1,7

Das 59 cepas dos gêneros *Macrococcus* e *Staphylococcus* investigadas quanto a presença do gene *blaZ*, dez foram positivas (Tabela 12). O gene *blaZ* foi detectado em cepas pertencentes à cinco das doze espécies do gênero *Staphylococcus*, sendo relativamente mais frequente em *S. hyicus* (4/4) e *S. epidermidis* (2/3). Apenas uma cepa de *M. caseolyticus* foi positiva para o gene *blaZ*.

No teste de disco-difusão frente à cefoxetina, somente uma cepa de *M. caseolyticus* foi resistente, indicando a possível presença do gene *mecA*. Porém, quando submetida a PCR a cepa resultou negativa para o gene *mecA*.

Quanto à presença de genes codificadores para enterotoxinas clássicas, oito cepas de *Staphylococcus* spp. amplificaram algum gene para SAgS (Tabela 12). O gene mais frequente foi *seb* (n=7), seguido por *sed* (n=2), *sea* (n=1) e *see* (n=1). O gene para enterotoxina C não foi detectado. Três cepas apresentaram mais de um gene: duas cepas de *S. epidermidis* (*seb* e *sed*); e uma de *S. haemolyticus* (*sea* e *see*).

Tabela 12 – Presença do gene *blaZ* e genes de enterotoxinas clássicas em cepas do gênero *Macrococcus* e *Staphylococcus* isoladas de queijo colonial.

Espécie	Número de cepas	<i>blaZ</i> *	Genes enterotoxinas clássicas
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	24	1	-
<i>S. equorum</i>	10	-	-
<i>S. vitulinus</i>	6	1	-
<i>S. hyicus</i>	4	4	3
<i>S. saprophyticus</i>	4	1	2
<i>S. epidermidis</i>	3	2	2
<i>S. capitis</i>	1	-	-
<i>S. carnosus</i>	1	-	-
<i>S. carnosus subsp. Carnosus</i>	1	-	-
<i>S. chromogenes</i>	1	-	-
<i>S. fleurettii</i>	1	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	1	-	1
<i>S. succinus subsp. Casei</i>	1	-	-
<i>S. warneri</i>	1	1	-
Total	59	10 (16,9%)	8 (13,5%)

(*) número de amostras positivas para a presença do gene *blaZ*

Onze cepas apresentaram pelo menos um dos genes investigados, sendo que seis cepas apresentaram SAgS e *blaZ*, concomitantemente. Comparando-se os perfis de genes pesquisados (Tabela 13) das onze cepas positivas, *seb/blaZ* (n=4) e *blaZ* (n=3) foram os mais frequentes. O perfil *seb/blaZ* foi mais frequente em cepas de *S. hyicus* (n=3), proveniente de amostras de queijo de origem não relacionada.

Tabela 13 – Espécies identificadas por sequenciamento com sua origem e fatores de virulência.

Cepa	Espécie	Origem da amostra			Perfil de genes amplificados
		Marca	Banca	Coleta	
1	<i>S. haemolyticus</i>	C	M1	1 ^a	<i>sea-see</i>
2	<i>M. caseolyticus</i>	I	M5	1 ^a	<i>BlaZ</i>
3	<i>S. warneri</i>	D	M5	3 ^a	<i>blaZ</i>
4	<i>S. vitulinus</i>	C	M6	6 ^a	<i>blaZ</i>
5	<i>S. epidermidis</i>	P	M7	3 ^a	<i>seb-sed, blaZ</i>
6	<i>S. hyicus</i>	K	F2	8 ^a	<i>seb, blaZ</i>
7	<i>S. hyicus</i>	D	F5	2 ^a	<i>seb, blaZ</i>
8	<i>S. saprophyticus</i>	B	F6	2 ^a	<i>seb</i>
9	<i>S. saprophyticus</i>	B	F6	5 ^a	<i>seb, blaZ</i>
10	<i>S. hyicus</i>	F	F6	2 ^a	<i>seb, blaZ</i>
11	<i>S. epidermidis</i>	O	F6	8 ^a	<i>seb-sed, blaZ</i>

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus spp. coagulase negativo (CNS) foram considerados, por muito tempo, apenas como contaminantes em alimentos. Contudo, o relato dessas espécies causando doenças em humanos e animais, bem como a confirmação de sua capacidade enterotoxigênica, tem levantado dúvidas quanto a sua possível contribuição em intoxicações alimentares (BALABAN; RASSOLY, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2010; HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; MARTINS *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2016). Apesar disso, a legislação brasileira que regulamenta os padrões de qualidade microbiológica de alimentos não preconiza a pesquisa destas bactérias em alimentos envolvidos em surtos (BRASIL, 2001); contribuindo, desta forma, para a falta de dados quanto a sua presença nesses eventos. Esta nova perspectiva trouxe à tona a necessidade da pesquisa de CNS em alimentos buscando sua identificação, a nível de espécie, e a verificação da presença de genes de virulência como os que codificam enterotoxinas e conferem resistência bacteriana.

Considerando a existência de mais de 40 espécies neste grupo, a identificação de CNS não é uma tarefa simples. As metodologias tradicionais de identificação fenotípica são consideradas demoradas e sistemas de identificação comerciais, apesar de rápidos, são limitados, identificando apenas espécies mais comumente isoladas de amostras clínicas. Ao contrário, técnicas moleculares de identificação são consideradas mais precisas e rápidas, sendo o método de escolha quando da identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa a nível de espécie (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012; RUARO *et al.*, 2013; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2015).

O gene 16S rRNA, altamente conservado em *Staphylococcus* spp., é o alvo mais comumente utilizado na identificação destas espécies (EDWARDS; KAUFMANN; SAUNDERS, 2001; MELLMANN *et al.*, 2006; FONTES, 2013; RUARO, 2013), sendo os primeiros 500pb a sequência alvo mais frequentemente utilizada (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008 *apud*. LANGE *et al.*, 2015). Além deste gene, outras sequências, como as que codificam os genes *gap*, *gyrA*, *sodA*, *rpoB*, *tuf* e *hsp60*, têm sido pesquisadas e tem gerado resultados satisfatórios (DRANCOURT; RAOULT, 2002; GHEBREMEDHIN *et al.*, 2008; ONNI *et al.*, 2010; BERGERON *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2011; GERAGHTY *et al.*, 2013). No entanto, ainda não foram encontrados alvos inquestionáveis para a identificação bacteriana e o poder

discriminatório desses alvos difere conforme as espécies estudadas. Por exemplo, enquanto o 16S rRNA apresentou baixo poder discriminatório para espécies como *S. caprae* e *S. capitis* (HWANG *et al.*, 2011) o gene *tuf* não foi capaz de identificar *Staphylococcus pseudintermedius* e *S. delphini* (GERAGHTY *et al.*, 2013) e o gene *gap* falhou na identificação das espécies *S. felis*, *S. fleurettii* e *S. vitulinus* (BERGERON *et al.*, 2011).

Independente do alvo escolhido, algumas técnicas também podem auxiliar no aumento do poder discriminatório da sequência alvo. Além disso, a escolha de regiões hipervariáveis, aumenta o poder discriminatório do sequenciamento de 16S rRNA (HEIKENS *et al.*, 2005; DELBÈS; MONTEL, 2005, PETROSINO *et al.*, 2009). A partir da amplificação e sequenciamento da região V1-V3, Ruaro (2013) identificou 13 espécies de CNS isolados de leite e queijo. Segundo Delbès; Montel (2005), a região V2 do gene 16S rRNA discriminaria melhor as espécies mais frequentemente encontradas em queijo. Lange (2015), usando o sequenciamento de um fragmento de 536pb, identificou 95% dos 213 *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de mastite. O gene 16S rRNA também tem sido utilizado com sucesso na pesquisa de microbiota total de alimentos (DELBÈS; MONTEL, 2005; JANSSENS *et al.*, 2013; GAROFALO *et al.*, 2017).

No presente estudo, a identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa foi realizada pela amplificação e sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S rRNA. Considerando uma similaridade de 99-100% com as sequências depositadas no GenBank, foram identificadas 13 espécies bacterianas, das quais, *Macrococcus caseolyticus* foi a mais frequente (24/59). Apesar de existirem poucos relatos quanto à importância do isolamento desta espécie em alimentos, esta é tipicamente isolada da pele de animais e alimentos, como leite e carne (BABA *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2011; CICONI-HOGAN *et al.*, 2014). Classificado inicialmente como *Staphylococcus caseolyticus*, *M. caseolyticus* não é reportado, usualmente, como causa de doença em humanos ou animais; no entanto, sua importância pode estar associada à possibilidade de carrear genes de resistência antimicrobiana como, por exemplo, o cassete cromossômico *mec* (SCCmec), relacionado à resistência à meticilina em espécies patogênicas, como *Staphylococcus* spp. (BABA *et al.*, 2009; TSUBAKISHITA *et al.*, 2010; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2015).

Especula-se, ainda, que esse cassete gênico possa sofrer rearranjos em *M. caseolyticus* gerando novas variantes. Analisando o genoma completo de *M. caseolyticus* resistente à meticilina isolado de carne de frango, Baba *et al.* (2009) verificaram a presença de um plasmídeo portador do gene *mecA* com um grupo único de genes (*mecIm-*

*mecRI*m-*mecAm*-*blaZ*m) considerado, pelos autores, como uma possível forma ancestral do determinante da resistência à meticilina reportado em *S. aureus*. Tsubakishita *et al.* (2010) analisando a mesma cepa, citada anteriormente, descreveram um novo elemento *SCCmec* que, segundo os autores, revelou um potencial mecanismo de geração de *SCCmec* em *Micrococcus*. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Gómez-Sanz, *et al.* (2015) identificaram um elemento *SCCmec* carreador de *mecB*, em uma amostra clínica de cão.

Staphylococcus spp. coagulase negativa são isolados de uma variedade de alimentos (MARTINS *et al.*, 2014). Diversos estudos pesquisaram a comunidade de CNS em queijos e em outros alimentos (RALL *et al.*, 2010; KÜREKCI, 2016; NUNES *et al.*, 2016), porém, a investigação de CNS em queijo colonial, produto típico do Rio Grande do Sul, ainda é escassa. No presente estudo, foi possível confirmar a presença e diversidade destes micro-organismos em queijo colonial. Foram identificadas 11 espécies e 2 subespécies de CNS, incluindo *Staphylococcus equorum*, *S. vitulinus*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. fleurettii*, *S. haemolyticus*, *S. succinus* subsp. *casei* e *S. warneri*.

Comparando-se os resultados obtidos, com aqueles de produtos similares observam-se semelhanças entre espécies frequentemente isoladas em queijos. Em estudo realizado por Coton *et al.* (2010), *Staphylococcus equorum* também foi a espécie do gênero *Staphylococcus* mais frequentemente isolada de queijos na França. Por outro lado, *S. hyicus*, *S. fleurettii* e *S. carnosus*, isolados no presente estudo, não foram encontrados nos queijos franceses. Enquanto no presente estudo apenas quatro (6,8%) isolados foram identificados como *S. saprophyticus*, a espécie foi a mais isolada em queijos na Turquia e em outros tipos de queijos no Brasil (RALL *et al.*, 2010; KÜREKCI, 2015; NUNES *et al.*, 2016). Corroborando com o presente estudo, *S. equorum* foi a espécie mais encontrada em leite cru e queijo analisados no norte da Itália (RUARO *et al.*, 2013).

Representado por duas subespécies, *S. equorum* subsp. *equorum* e *S. equorum* subsp. *linens*, sendo esta última relacionada a queijos maturados (SCHLEIFER; BELL, 2009; PLACE *et al.*, 2003), *S. equorum* é frequentemente isolado de alimentos e ambientes de processamento. Em estudo realizado por Coton *et al.* (2010), analisando isolados de queijos, linguiças e ambientes de processamento na França, a espécie foi predominante nos ambientes de processamento, bem como, no leite e produtos finais. Da mesma forma, a espécie foi a mais frequentemente isolada de ambiente de processamento de queijos em Portugal, porém, embora não tenha sido predominante na matéria-prima

(leite), manteve-se como a mais isolada no produto final, indicando sua capacidade de adaptação aos ambientes de processamento (SOARES *et al.*, 2011). A presença da espécie é vista, na maioria das vezes, como benéfica, pois está relacionada com características de sabor e cor específicas de produtos fermentados (JANSSENS *et al.*, 2013) exceção se dá quando estão relacionadas a fatores de virulência como a produção de enterotoxinas e resistência bacteriana (RESCH; NAGEL; HERTEL, 2008; SOARES *et al.*, 2011; MIKULÁSOVÁ *et al.*, 2014; FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016).

Diferenças nos rebanhos leiteiros, nos ambientes de produção animal, bem como, nos processos de fabricação, distribuição e comercialização dos queijos podem contribuir para a diversidade dos micro-organismos isolados nesses produtos (ANDRÉ *et al.*, 2008; PIESSENS *et al.*, 2011; MONSALLIER *et al.*, 2012). Analisando amostras de leite e ambiente em seis rebanhos diferentes, Piessens *et al.*, (2011) observaram diferenças entre as espécies encontradas nos dois tipos de amostras, bem como entre os rebanhos. As espécies predominantes no leite foram *Staphylococcus chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. simulans*, enquanto no ambiente predominaram *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus* e *S. fleurettii*. Apesar do estudo ter sido conduzido no intuito de entender a epidemiologia de infecções intramamárias, este conhecimento pode ser transferido para a contaminação da matéria-prima (leite) utilizada na fabricação de queijos.

Da mesma forma que nas mastites, espécies frequentemente encontradas no ambiente (*S. haemolyticus*, *S. equorum* e *S. simulans*) podem significar contaminação ambiental da matéria-prima, enquanto espécies raramente encontradas em amostras ambientais (*S. chromogenes* e *S. epidermidis*) tenham outros reservatórios como fonte. Em estudo, comparando *S. epidermidis* isolado de amostras humanas e de leite bovino, Thorberg *et al.*, (2006) sugerem que os humanos sejam a provável fonte de contaminação do leite por esta espécie, uma vez que a bactéria em questão, não é habitante natural da pele de bovinos.

Muitas das espécies de CNS isoladas são consideradas microbiota natural do alimento, principalmente em produtos fermentados como alguns queijos e salames (BLAIOTTA *et al.*, 2004); no entanto, a possibilidade de serem carreadores de genes de virulência como os que codificam enterotoxinas pode representar um risco para a saúde do consumidor. 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; VERNOZY-ROZAND, 2004; CREMONESI *et al.*, 2005; CHAVES, 2012; SATO'O *et al.* 2014).

Embora *S. aureus* seja considerado o principal responsável por produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012), a capacidade enterotoxigênica de espécies coagulase negativa já foi confirmada, suportando a possibilidade de que CNSs possam estar envolvidos em intoxicações alimentares (CARMO *et al.*, 2002; LAMAITA *et al.*, 2005; TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2006; OTTO, 2009; PIETTI; VERSCHRAEGEN, 2009; MAZZARIOL *et al.*, 2012; ÜNAL; ÇINAR, 2012). No presente estudo, a presença de genes codificadores para enterotoxinas clássicas, foi confirmada em 23% das cepas de CNS isoladas, sendo *seb* o gene mais frequente, seguido por *sed*, *sea* e *see*, enquanto o gene para enterotoxina C não foi detectado. Além disso, três cepas apresentaram mais de um gene produtor de enterotoxina: duas cepas de *S. epidermidis* (*seb* e *sed*); e uma de *S. haemolyticus* (*sea* e *see*).

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 à surtos alimentares (ROSENGREN *et al.*, 2010; NUNES; CALDAS, 2017), porém dados de frequência desses genes em CNS ainda são escassos e divergem conforme a localidade e fonte dos isolados. Em estudo realizado por Rosec; Gigaud (2002), nenhum dos 74 CNS isolados de alimentos na França, carregavam genes para enterotoxinas clássicas, resultado semelhante foi obtido por Ruaro *et al.*, (2013), analisando CNSs isolados de leite cru e queijos no norte da Itália. No entanto, a frequência desses genes foi superior a 40% em CNSs isolados de alimentos, ambiente de serviços alimentares e manipuladores de alimentos no Brasil (MELLO *et al.*, 2014). Vinte e seis por cento dos *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijo Minas, analisados por Rall *et al.* (2010), foram positivos para a presença de genes que codificam SEs e frequência semelhante foi observada em isolados de mastite nos Estados Unidos (PARK *et al.*, 2011).

Quanto ao tipo de enterotoxina, mais uma vez nossos dados divergem dos estudos conduzidos em *S. aureus*. Enquanto nos CNS isolados de queijo colonial os genes mais frequentes foram *seb* e *sed*, em *S. aureus* *sea* é mais comumente encontrado. Dados semelhantes foram encontrados, também, nos estudos com CNS, realizados por Mello *et al.* (2014) e Park *et al.* (2011), nos quais o gene *seb* foi o mais frequente. Em

contrapartida, o gene *sea* foi o mais comum em CNS isolados de queijos no estado de São Paulo (RALL *et al.*, 2010).

As diferenças existentes tanto na frequência, quanto no tipo de genes amplificados em *S. aureus* e CNSs podem ser devido à grande diversidade de espécies estudadas e suas peculiaridades quando se tratam dos coagulase negativa. Outra possibilidade é que a maioria dos estudos com *S. aureus* são referentes a cepas isoladas de alimentos associados a surtos, enquanto nos estudos com CNS esses alimentos geralmente não têm tal histórico. Quando Veras *et al.* (2008), analisaram CNS de alimentos associados a surtos a frequência de SE chegou a 62%, corroborando com essa hipótese.

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.

No presente estudo, foram observadas contagens de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus coagulase-positiva* em ágar *Baird-Parker* na ordem de até 10^6 UFC.g⁻¹, apesar dessas colônias não serem consideradas a população total de estafilococos na amostra, elas sugerem os níveis de contaminação bacteriana. Considerando que parte dessa população foi confirmada como CNS e algumas cepas carregavam genes de enterotoxinas, a possibilidade de intoxicação alimentar após a ingestão desse alimento, mesmo que remota, não pode ser ignorada. 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).

A contaminação inicial pode ser um fator determinante para a segurança do alimento, considerando que, uma vez produzidas, as enterotoxinas podem persistir no alimento mesmo depois do tratamento térmico (NECIDOVA *et al.*, 2016). No caso do produto em estudo, elaborado com leite pasteurizado, essas contagens bacterianas podem ser reflexo de falhas no tratamento térmico, contaminação excessiva da matéria-prima (leite), a qual a pasteurização não foi suficiente para reduzir a carga bacteriana, recontaminação do leite durante o processo de fabricação do queijo, além da contaminação no transporte e distribuição (ANDRÉ *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2008).

As enterotoxinas podem ser expressas 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 micro-organismo. 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* spp. 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. 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).

A patogenicidade dos CNS vai além da possibilidade de causarem intoxicações alimentares pela produção de enterotoxinas. Um fator determinante de patogenicidade de

Staphylococcus spp. está associado com sua resistência a antimicrobianos (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 micro-organismos resistentes entre o ambiente e humanos (FIJALKOWSKI; PEITLER; KARAKULSKA, 2016).

A resistência a um dos antibacterianos amplamente utilizado no controle de infecções estafilocócicas, a penicilina, foi avaliada no presente estudo, pela amplificação do gene *blaZ*. Entre as 24 cepas de *Macrococcus caseolyticus*, somente uma albergava o gene *blaZ*. Dos trinta e cinco CNS analisados, 9 amplificaram o gene *blaZ*, representando uma frequência de 25,7% de cepas resistentes à penicilina. Esta frequência pode ser considerada baixa se comparada a estudos realizados com outros tipos de alimentos. Avaliando estafilococos 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).

As divergências entre a frequência de resistência à penicilina observada, no presente estudo, podem estar relacionadas a diferença quanto às espécies isoladas em cada um dos estudos citados. Enquanto a maioria das cepas isoladas em nosso estudo eram *S. equorum* (nenhum amplificou genes de resistência), as principais cepas isoladas nos estudos em que a frequência de *blaZ* foi elevada pertenciam a *S. epidermidis* (PODKOWIK; BYSTRON; BANIA 2012), *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (KÜREKCI, 2015), *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* (SREDNIK *et al.*, 2015).

No presente estudo, todas as cepas de *S. hyicus* (4/4) e 66% das cepas de *S. epidermidis* apresentaram o gene de resistência à penicilina. Essas espécies estão entre os CNSs frequentemente relacionadas com infecções intramamárias em bovinos, bem como, associadas a outras infecções em animais. *Staphylococcus epidermidis* foi a segunda espécie de CNS mais relacionada a mastites persistentes nos rebanhos estudados por Thorberg *et al.* (2009). Em estudo realizado por Even *et al.* (2010), avaliando o risco das principais espécies de CNS isoladas de alimentos e de amostras clínicas (*S. epidermidis* e *S. saprophyticus*), o risco associado a *S. epidermidis* foi considerado acentuando devido à frequência de 69% das cepas resistentes a 5 ou mais antimicrobianos. *Staphylococcus hyicus* está intimamente relacionado à animais de produção, sendo um importante

patógeno em granjas de suínos como agente de epidermite exsudativa (PARK *et al.*, 2013).

A forma de resistência mais comum à penicilina está relacionada à habilidade que *Staphylococcus* spp. adquirem de produzir a enzima β -lactamase, impedindo sua ação sobre a parede celular da bacteriana (PEACOCK; PATERSON, 2015). Essas enzimas são codificadas pelo gene *blaZ* que pode estar localizado no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006) podendo ser disseminado horizontalmente por meio de elementos genéticos móveis (MALACHOWA; DELEO, 2010; ALIBAYOV *et al.*, 2014). A transferência desses genes já foi relatada entre *S. aureus* e outras espécies, indicando que outros estafilococos, como os CNS, podem atuar como reservatórios de genes de resistência para *S. aureus* e vice-versa, principalmente considerando microambientes, onde residem diversas espécies de estafilococos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006).

A meticilina veio como alternativa para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. refratários à penicilina. Nenhuma das cepas de CNS, isoladas neste estudo, apresentaram fenótipo de resistência à meticilina, e apenas uma cepa de *M. caseolyticus* foi fenotipicamente resistente à cefoxitina; porém, a presença do gene *mecA* não foi confirmada. Esses resultados são positivos à medida que a resistência à meticilina tem sido reportada em cepas associadas a infecções hospitalares, dificultando o tratamento dessas doenças.

A divergência entre a resistência fenotípica e genotípica observada na cepa de *M. caseolyticus* pode estar associada a vários mecanismos. A resistência à meticilina não associada ao gene *mecA* já foi relatada. Essa resistência pode estar associada a diversos mecanismos como, por exemplo, a atividade aumentada das β -lactamases, mutações pontuais nas proteínas ligantes à penicilina (PBP) ou à presença de genes *mec*-homólogos, os quais não são amplificados em PCRs cujo alvo seja *mecA* (PEACOCK; PATERSON, 2015). Considerando que a cepa em questão foi negativa também para o gene *blaZ*, exclui-se a possibilidade de o fenótipo estar associado à atividade de β -lactamases; no entanto, genes homólogos ao *mecA* já foram relatados em *M. caseolyticus* (BABA *et al.*, 2009; TSUBAKISHITA *et al.*, 2010; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2015), sugerindo que esta possa ser uma das explicações para esta divergência.

Ainda que baixa, a resistência à meticilina tem sido observada em diversos estudos com CNS. A prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa resistente à meticilina (MR-CoNS) variou de 2% em produção orgânica de leite a 5% em produção convencional

nos Estados Unidos (CICCONI-HOGAN *et al.*, 2014), enquanto a prevalência foi de 6,5% de MR-CoNS isolados de mastite bovina entre 2010 e 2013 na Argentina (SREDNIK *et al.*, 2015). *Staphylococcus* spp. coagulase negativa isolados de leite bovino entre 2001 e 2004 na Holanda apresentaram 0,04% de cepas positivas para o gene *mecA* (SAMPIMON *et al.*, 2011).

A possibilidade de transferência de genes que conferem resistência a antimicrobianos é, sem dúvida, muito relevante, particularmente entre bactérias habitualmente isoladas de alimentos, as quais tem sua presença, muitas vezes, negligenciada por serem consideradas não-patogênicas. O papel dos CNS nesses alimentos ainda não está claramente definido, porém, seu potencial como reservatório de genes de resistência tem sido sugerido por alguns pesquisadores, sobretudo pela localização de alguns desses genes em elementos móveis (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2005). Tal consideração foi feita por Podkowik; Bystron; Bania (2012) quando, ao avaliarem *Staphylococcus aureus* e CNS isolados de alimentos, verificaram maior frequência de genes de resistência a antimicrobianos nas espécies coagulase negativa. No entanto, segundo Olsen; Christensen; Aarestrup (2005), a transferência de *blaZ* entre espécies foi considerado um evento extremamente raro, considerando que esses pesquisadores detectaram o mesmo tipo do gene em apenas um caso das 143 amostras isoladas de humanos e bovinos.

Entretanto, a preocupação imediata quando se trata de contaminação de alimentos ainda são as doenças alimentares que, no caso dos estafilococos, são as intoxicações, causadas, principalmente, por *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. No presente estudo, assim como no caso de genes de resistência aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas, genes que codificam as enterotoxinas mais frequentemente relacionadas a surtos alimentares, foram identificados em frequências relativamente baixas.

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns no mundo (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012) e, apesar da subnotificação dos casos, está entre as três principais causas de DTA no Brasil (BRASIL, 2016). Leite e seus derivados estão entre os alimentos frequentemente relacionados a esta doença (BORGES, 2008; LANGER *et al.*, 2012). Dos surtos cujo alimento foi identificado, entre os anos de 2007 e 2016, leite e derivados estiveram entre os quatro mais frequentes (BRASIL, 2016). Ainda no Brasil, os queijos

tipo Minas e coalho estão entre os derivados lácteos mais incriminados em surtos (BORGES, 2008).

Considerando a importância dos queijos neste cenário, estudos matemáticos têm sido utilizados para avaliar o risco de intoxicação alimentar associado ao consumo deste alimento em alguns países. Lee *et al.* (2015) e Nunes e Caldas (2017) ao realizarem modelagens matemáticas relacionadas a queijos consumidos na Coreia e no Brasil, respectivamente, considerando a prevalência de cepas toxigênicas de *S. aureus*, observaram um baixo risco de intoxicação estafilocócica relacionada ao consumo desses alimentos. Sabendo-se que tais análises levam em conta uma diversidade de fatores, como dose tóxica, população bacteriana, temperatura de estocagem, entre outros, a extrapolação desses dados para outros micro-organismo e outros alimentos é pouco adequada, no entanto, esses dados podem auxiliar na construção de novos cenários como, por exemplo, em uma futura avaliação de risco da presença de CNS em alimentos.

A exemplo de outros estudos que investigaram a presença de CNS em alimentos, a diversidade de espécies coagulase negativa no queijo colonial, comercializado em Feiras Modelo e no Mercado Público de Porto Alegre, foi confirmada. Contudo, a frequência de cepas carreadoras de genes de resistência à penicilina e meticilina, bem como, genes codificadores de enterotoxinas clássicas, foi relativamente baixa. Aliado a isso, a manutenção da cadeia do frio, observada na maioria das coletas realizadas neste estudo, levam a crer que o risco de intoxicação pelo consumo deste queijo, associado somente à população de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, possa, também, ser baixo.

6 CONCLUSÃO

A diversidade de espécies coagulase negativa no queijo colonial, comercializado em Feiras Modelo e no Mercado Público de Porto Alegre, foi confirmada. Tendo como espécies mais frequentes *Staphylococcus equorum*, *S. vitulinus*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*, além da presença de *Macrococcus caseolyticus* em 40% dos isolados analisados.

A frequência de cepas carreadoras de genes de resistência à penicilina e meticilina, bem como, genes codificadores de enterotoxinas clássicas, foi relativamente baixa, levando a crer que o risco de intoxicação pelo consumo deste queijo, associado somente à população de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, possa, também, ser baixo.

REFERÊNCIAS

- AYLIFFE, G. A. J. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, n. Suppl1, p. 74-79, Jan. 1997.
- ALEXOPOULOU, K. *et al.* Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 450-454, June 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2006.01964.x/pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- ALIBAYOV, B. *et al.* *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 41, n. 8, p. 5005-5018, Aug. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-014-3367-3>>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- 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**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 200-207, Feb. 2008.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, June 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153270/>>. Acesso em: 28 nov. 2016.
- BABA, T. *et al.* Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic *Staphylococci*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 10, p. 1180-1190, Feb. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687160/>>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- BAIRD-PARKER, A. C. A classification of *Micrococci* and *Staphylococci* based on physiological and biochemical tests. **Journal of General Microbiology**, London, v. 30, p. 409-427, Mar. 1963. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-30-3-409>>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins – Review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, June 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](http://dx.doi.org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)>. Acesso em: 6 dez. 2016.
- 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.

BAUMGARTNER, A.; NIEDERHAUSER, I.; JOHLER, S. Virulence and resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 77, n. 7, p. 1232-1236, July 2014.

BECKER, K. *et al.* Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, Nov. 2004.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 4, p. 870-926, Oct. 2014. Disponível em: < doi:10.1128/CMR.00109-13>. Acesso em: 27 nov. 2016.

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, Oct. 2014.

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.

BERGERON, M. *et al.* Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 30, n. 3, p. 343-354, Mar. 2011.

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. Disponível em: < <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n2415a.pdf>> Acesso em: 23 nov. 2016.

BLAIOTTA, G. *et al.* Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 271-284, May 2004.

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.

BORGES, M. F. *et al.* *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

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: 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 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.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002.

CAPURRO, A. *et al.* Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 3-4, p. 327-333, Mar. 2009.

CARMO, L. S. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb. 2002. Disponível em: <doi:10.1006/fmic.2001.0444> Acesso em: 6 dez. 2016.

CARVALHO, M. P.; VENTURINI, C. E. P.; GALAN, V. B. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. MILKPOINT, 2015. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 8 fev. 2017.

CASTRO, A. C. S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo Mussarela comercializados no CEASA de Vitória da Conquista – BA. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 3, p. 407-413, jul./set. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014, Annual Report.** Georgia: US Department of Health and Human Services, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-outbreaks-annual-report-2014-508.pdf>>. Acesso me: 4 jan. 2017.

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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475289>>. Acesso em: 6 dez. 2016.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Ciência Equatorial**, Macapá, v. 2, n. 1, 14 p., 1º semestre 2012.

Disponível em:

<<https://periodicos.unifap.br/index.php/cienciaequatorial/article/view/567/v2n1TiagoC.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

CICCONI-HOGAN, K. M. *et al.* Short communication: prevalence of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from bulk milk on organic and conventional dairy farms in the United States. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 97, n. 5, p. 2959-5964, May 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline. Wayne, v. 28, n. 12, 2008. (CLSI document MM18-A) *In*: LANGE, C. C. *et al.* Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 176, n. 3-4, p. 382-388, Apr. 2015.

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

COTON, E. *et al.* Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 221-229, Feb. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061042>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

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, Oct. 2005.

DELBÈS, C.; MONTEL, M. C. Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 169-174, June 2005.

DELPOR, J. A. *et al.* Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by the Bruker MALDI-TOF Biotyper compared to the Vitek 2 and MIS Gas Liquid Chromatography. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 1, n. 1, p. 1-5, June 2015. Disponível em: <DOI: 10.15406/jbmoa.2015.01.00003>. Acesso em: 18 jan. 2017.

DIAZ, R. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new mecC gene – a meta-analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 84, n. 2, p. 135-140, Feb. 2016.

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. Disponível em: <<http://booksc.org/book/26146347>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1333-1338, Apr. 2002.

DUIJKEREN, E. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 12, p. 2705-2714, Dec. 2011. Disponível em: <doi: 10.1093/jac/dkr367>. Acesso em: 10 jan. 2017.

EDWARDS, K. J.; KAUFMANN, M. E.; SAUNDERS, N. A. Rapid and Accurate Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3047-3051, Sept. 2001.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing nomenclature**. [Paris], 19 Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

EVEN, S. *et al.* Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1-2, p. 87-95, Apr. 2010.

FAIRBROTHER R.W. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 50, n. 1, p. 83-88, Jan. 1940. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/path.1700500112>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

FAVA, L. W. *et al.* Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 4, p. 1-6, jul. 2012.

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. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/7949/5676>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

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, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Staphylococci+isolated+from+ready-to-eat+meat+%E2%80%93+Identification%2C+antibiotic+resistance+and+toxin+gene+profile>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

FISCHER, M. M. **Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no estado do Rio Grande do Sul entre 2004-2012**. 2013. 41 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FLEMING A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929 (reimpressão *Review of Infectious Diseases*, Chicago, v. 2, p. 129-139, 1980). Disponível em:

<file:///C:/Users/Tatiana/Downloads/clinids%252F2.1.129.pdf> Acesso em: 29 dez. 2016.

FONTES, C. O. *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA* – encoding Coagulase-Negative Staphylococci isolated from soft cheese in Brazil. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 594-599, Apr. 2013.

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. *In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE DEFESA AGROPECUÁRIA, IV, 2013, Belém. Resumos...* Belém: Departamento de Defesa Agropecuária, Pará, 2013.

GANDOLFI-DECRISTOPHORIS, P. *et al.* Prevalence and risk factors for carriage of multi-drug resistant *Staphylococci* in healthy cats and dogs. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 14, n. 4, p. 449-456, Dec. 2013.

GAROFALO, C. *et al.* Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 242, p. 24-36, Feb. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.008>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 327-360, Dec. 1989. Disponível em: <[doi:10.1016/0168-1605\(89\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90100-1)>. Acesso em: 30 nov. 2016.

GERAGHTY, L. *et al.* Investigations on the efficacy of routinely used phenotypic methods compared to genotypic approaches for the identification of staphylococcal species isolated from companion animals in Irish veterinary hospitals. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 66, n. 7, p. 1-9, May 2013.

GHEBREMEDHIN, B. *et al.* Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 1019-1025, Mar. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268370/>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

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 *Macroccoccus caseolyticus* isolated from canine infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 8, p. 4577-4583, Aug. 2015.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K-H. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: **DWORKIN, M. et al.** (Eds.). **The Prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 4, cap. 1.2.1, p. 5-75.

GRAVELAND, H. *et al.* Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 301, n. 8, p. 630-634, Dec. 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S. PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n3/35.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

HARRYS, T.O. *et al.* Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 61, n. 8, p. 3175-3183, Aug. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC280985/>>. Acesso em: 6 Dez. 2016.

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, Mar. 2013.

HASHMI, A. *et al.* Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from urinary tract infection specimens. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**, Karachi, v. 26, n. 7, p. 581-584, July 2016.

HÉBERT G. A. *et al.* Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 1939-1949, Oct. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266795/>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

HEIKENS, E. *et al.* Comparison of Genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, May 2005.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Review**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 815-836, July 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091892>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

HITZENBICHLER, F. *et al.* Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. **Infection**, München, Sept. 2016. Disponível em: <DOI: 10.1007/s15010-016-0945-4>. Acesso em: 27 jan. 2017.

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.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 50, p. 223-236, Feb. 1999.

HWANG, S. M. *et al.* *tuf* gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4142-4149, Dec. 2011.

IBRAHIM, M. B. *et al.* Species of coagulase-negative Staphylococci isolated from anterior nares and milk of ruminant animals and contacts persons in Maiduguri, Nigeria. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 5, p. 128-131, Sept. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: aquisição alimentar per capita Brasil e grandes regiões**. Rio de Janeiro, RJ, 2010.

IORIO, N. L. P. *et al.* Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 8, n. 45, p. 2564-2569, Aug. 2007.

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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Safety+assessment+of+dairy+microorganisms%3A+Coagulase-negative+staphylococci>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

IWASE, T. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature**, London, v. 465, n. 7296, p. 346-349, May 2010.

JANSSENS, M. *et al.* Community dynamics of coagulase-negative staphylococci during spontaneous artisan-type meat fermentations differ between smoking and moulding treatments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 168–175, Aug. 2013. Disponível em: <doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.034.>. Acesso em: 10 jan. 2017.

JARRAUD, S. *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 631-641, Feb. 2002.

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.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 1, n. 1, p. 82-88, Jan. 1975.

- KIOOS, W. E. *et al.* Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* Spm nov., *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. **International journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 3, p. 859-877, Aug. 1998.
- KÜREKCI, C. *Short communication*: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 2675–2679, Apr. 2016.
- LAMAITA, H. C. *et al.* Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, out. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000500017>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- LANGE, C. C. *et al.* Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 176, n. 3-4, p. 382-388, Apr. 2015.
- 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.
- LEE, H. *et al.* Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* in natural and processed cheese in Korea. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, n. 9, p. 5931-5945, Sept. 2015.
- 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, June 2004. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 28 nov. 2016.
- MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 67, n. 18, p. 3057-3071, Sept. 2010.
- MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**. New York, v. 248, n. 4959, p. 705-711, May 1990. Disponível em: <<http://booksc.org/book/34586870>>. Acesso em: 6 dez. 2016.
- 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. Disponível em: <doi:10.1111/jfs.12112>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- MAZZARIOL, A. *et al.* Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 31, n. 4, p. 523-527, Apr. 2012.
- MELLMANN, A. *et al.* Sequencing and staphylococci identification. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 333-336, Feb. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3373113/>>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- 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.
- MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surtos 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.
- MIKULÁSOVÁ, M. *et al.* Multiresistance of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* from Slobak Bryndza cheese. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 59, n. 3, p. 223-227, May 2014.
- MONSALLIER, F. *et al.* Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. **Dairy Science & Technology**, Les Ulis, v. 92, n. 3, p. 265-278, Apr. 2012. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00930628/document>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- MURAKAMI, K. *et al.* Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, Oct. 1991.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALER, M. A. **Medical Microbiology**, 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016. 805 p.
- NASCIMENTO, C. B. **Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011**. 2013. 36 f. Monografia (Especialização em Produção, Higiene e Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11252>> Acesso em: 28 nov. 2016.
- NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 7, p. 585–594, June 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01414-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01414-9)>. Acesso em: 28 nov. 2016.

NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 73, Part B, p. 524-531, Mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodcont.2016.08.046>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

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, Apr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9693>> Acesso em: 7 abr. 2016.

OGSTON, A. *Micrococcus* poisoning. **Journal Anatomy and Physiology**, London, v. 17, Pt 1, p. 24-58. 1883. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310127/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4329/3586>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n.7, p. 475-481, Sept., 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Behavior+and+Enterotoxin+Production+by+Coagulase+Negative+Staphylococcus+in+Cooked+Ham%2C+Reconstituted+Ski+mmed+Milk%2C+and+Confectionery+Cream>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 57, n. 3, p. 450-460, Mar. 2006.

ONNI, T. *et al.* Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 347-352, Aug. 2010.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nature Review Microbiology**, London, v. 7, n. 8, p. 555-567, Aug. 2009.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 127, 12 p., Apr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321498/>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

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, Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect->

com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0378113510003238>. Acesso em: 5 dez. 2016.

PARK, J. *et al.* An investigation of resistance to β -lactam antimicrobials among staphylococci isolated from pigs with exudative epidermitis. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 211, 8 p., Oct. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131819>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/factors-staphylococcal-enterotoxin-dairy.pdf>> acesso em: 28 nov. 2016.

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.

PELZER, K. *et al.* Modification of Baird-Parkers's classification system of *Staphylococcus albus*. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 249–257, July 1973.

PEREIRA, V. C.; CUNHA, M. L. R. S. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p. 939-942, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141968>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

PETROSINO, J. F. *et al.* Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 5, p. 856-866, May 2009.

PIESSENS, V. *et al.* Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, n. 6, p. 2933-2944, June 2011.

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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18986783>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

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. Disponível em: <[doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.018)>. Acesso em: 4 jan. 2017.

PLACE, R. B. *et al.* *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 30-37, Mar. 2003.

PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Prevalence of antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from ready-to-eat meat products. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 15, n. 2, p. 233-237, Jan. 2012.

PODKOWIK, M. *et al.* Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 34-40, Apr. 2013. Disponível em: <doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.>. Acesso em: 10 jan. 2017.

QUINN, J. P. *et al.* **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2nd ed. Wiley, 2011. 400 p.

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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Polymerase+chain+reaction+detection+of+enterotoxinas+genes+in+coagulase-negative+staphylococci+isolated+from+brazilian+minas+cheese.>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 51, n. 3, p. 386-389, Dec. 1942. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-51-13986>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

RESCH, M.; NAGEL, V.; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 99-104, Sept. 2008.

ROLA, J. G. *et al.* Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, n. 7, p. 4273-4278, July 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25981078>> Acesso em: 5 dez. 2016.

ROSEC, J. P. E.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1-2, p. 61-70, July 2002. Disponível em: <http://ac-els-cdn-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/S0168160502000442/1-s2.0-S0168160502000442-main.pdf?_tid=831ef690-9ba3-11e6-96c1-00000aacb35d&acdnat=1477503906_74270392fff732bc9c397f69c1624752> Acesso em: 26 out. 2016.

ROOS, T. B. *et al.* Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 94-96, jun. 2005.

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.

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. Disponível em: <doi:10.1016/j.fm.2012.11.013.>. Acesso em: 23 nov. 2016.

RUZAUSKAS, M. *et al.* Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. prevalence in Lithuanian dogs: a cross-sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 85, n. 2, p. 175-187, Nov. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25431281>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

SAMPIMON, O. C. *et al.* Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 300-305, May 2009.

SAMPIMON, O. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 173-179, May 2011.

SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SATO'O, Y. *et al.* Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, n. 7, p. 2637-2640, July 2014.

SHAW, C.; STITT, J. M.; COWAN, S. T. Staphylococci and their classification. **Journal of General Microbiology**, London, v. 5, p. 1010-1023, 1951. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/5/5/mic-5-5-1010.pdf?expires=1484822978&id=id&accname=guest&checksum=2ABC9DA523A1EC4BB0330B276552FB5A>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

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.

SCHULZ, J. *et al.* Longitudinal study of the contamination of air and soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 16, p. 5666-5671, Aug. 2012.

SOARES, J. C. *et al.* Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 123-129, Mar. 2011.

SREDNIK, M. E. *et al.* Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. **Journal of Infection in Developing Countries (electronic resource)**, Italy, v. 27, n. 9, p. 1022-1027, Sept.

2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409745>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 23-39, Feb. 2009.

THORBERG, M. B. *et al.* Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-3, p. 163-172, June 2006.

THORBERG, M. B. *et al.* Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 10, p. 4962-4970, Oct. 2009.

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, Jan. 2013.

TSUBAKISHITA, S. *et al.* Staphylococcal cassette chromosome *mec*-like element in *Macrococcus caseolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 4, p. 1469-1475, Apr. 2010.

TULINSKI, P. *et al.* Methicillin-resistant coagulase-negative on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 299-304, Jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081567>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

ÜNAL, N.; ÇINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–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.

VANDERHAEGHEN, W. *et al.* Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **Veterinary Journal**, London, v. 203, n. 1, p. 44-51, Jan. 2015.

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, Oct. 2004.

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.

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, maio-jun. 2007.

ZHANG, Y.; AGIDI, S. LEJEUNE, J. T. Diversity of cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 4, p. 1375-1383, Oct. 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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160508003954>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

ZOCHE, 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.

APÊNDICE A

Lista das 59 espécies identificadas por sequenciamento, com sua origem, enumeração de colônias típicas e atípicas e fatores de virulência analisados.

(continua)

Espécie	Coleta	Banca	Marca	Col. Típicas UFC.g ⁻¹	Col. Atípicas UFC.g ⁻¹	Gene codificador de enterotoxinas	blaZ
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	F2	J	2,0x10 ⁴	1,1x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	M3	F	3,5x10 ⁴	3,3x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	M4	I	<1	4,0x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	M4	C	2,3x10 ³	2,3x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	M5	I	1,0x10 ²	1,3x10 ⁵	-	POS ^I
<i>M. caseolyticus</i>	1 ^a	M7	C	1,2x10 ³	6,8x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	F6	F	2,2x10 ⁴	1,5x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	F6	F	2,2x10 ⁴	1,5x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	F6	Q	<1	2,2x10 ⁴	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	F8	J	<1	5,0x10 ⁴	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	M1	F	8,0x10 ³	2,8x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	M3	P	<1	1,3x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	2 ^a	M3	F	5,0x10 ⁴	3,1x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	3 ^a	F1	H	2,7x10 ⁴	8,0x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	3 ^a	F2	J	1,4x10 ³	2,2x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	4 ^a	F7	Q	<1	5,4x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	4 ^a	M7	P	3,0x10 ²	3,0x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	5 ^a	F4	F	3,1x10 ³	8,4x10 ⁴	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	5 ^a	F5	G	<1	1,1x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	6 ^a	F2	O	<1	2,6x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	6 ^a	M7	P	1,0x10 ³	4,7x10 ⁵	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	7 ^a	F6	O	<1	5,3x10 ⁴	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	7 ^a	M3	P	<1	1,2x10 ⁶	-	-
<i>M. caseolyticus</i>	8 ^a	F2	O	<1	5,7x10 ⁵	-	-
<i>S. capitis</i>	7 ^a	F8	E	2,0x10 ⁴	2,5x10 ⁴	-	-
<i>S. carnosus</i>	4 ^a	M2	P	2,0x10 ³	1,0x10 ⁵	-	-
<i>S. carnosus</i>	8 ^a	M6	P	1,0x10 ²	1,0x10 ⁵	-	-
<i>S. chromogenes</i>	2 ^a	F8	F	1,1x10 ⁴	2,6x10 ⁶	-	-
<i>S. epidermidis</i>	1 ^a	M5	D	1,4x10 ⁵	2,4x10 ⁶	-	-
<i>S. epidermidis</i>	3 ^a	M7	P	<1	4,3x10 ⁵	<i>seb-sed</i>	POS
<i>S. epidermidis</i>	8 ^a	F6	O	3,0x10 ³	1,2x10 ⁵	<i>seb-sed</i>	POS
<i>S. equorum</i>	1 ^a	F2	M	1,0x10 ³	2,5x10 ⁵	-	-
<i>S. equorum</i>	1 ^a	M7	B	<1	3,4x10 ³	-	-
<i>S. equorum</i>	2 ^a	F4	H	7,0x10 ²	3,0x10 ⁴	-	-
<i>S. equorum</i>	2 ^a	F8	H	4,0x10 ²	6,0x10 ⁴	-	-
<i>S. equorum</i>	3 ^a	M7	C	<1	9,0x10 ⁴	-	-
<i>S. equorum</i>	4 ^a	M7	B	<1	3,0x10 ⁵	-	-

(conclusão)

Espécie	Coleta	Banca	Marca	Col. Típicas UFC.g ⁻¹	Col. Atípicas UFC.g ⁻¹	Gene codificador de enterotoxinas	blaZ*
<i>S. equorum</i>	5 ^a	F3	N	3,8x10 ⁴	1,7x10 ⁵	-	-
<i>S. equorum</i>	6 ^a	M3	C	<1	1,8x10 ⁴	-	-
<i>S. equorum</i>	7 ^a	M2	C	<1	5,2x10 ⁴	-	-
<i>S. equorum</i>	8 ^a	M5	C	<1	6,5x10 ⁴	-	-
<i>S. fleurettii</i>	5 ^a	F2	M	<1	1,7x10 ⁵	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	1 ^a	M1	C	4,0x10 ²	1,5x10 ⁶	<i>sea-see</i>	-
<i>S. hyicus</i>	2 ^a	F5	D	3,5x10 ⁵	2,2x10 ⁶	<i>seb</i>	POS
<i>S. hyicus</i>	2 ^a	F6	F	1,6x10 ⁵	1,2x10 ⁶	<i>seb</i>	POS
<i>S. hyicus</i>	2 ^a	F7	F	1,5x10 ⁴	3,0x10 ⁶	-	POS
<i>S. hyicus</i>	8 ^a	F2	K	5,0x10 ⁴	5,4x10 ⁶	<i>seb</i>	POS
<i>S. saprophyticus</i>	2 ^a	F6	B	<1	2,7x10 ³	<i>seb</i>	-
<i>S. saprophyticus</i>	4 ^a	M5	C	<1	5,0x10 ³	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	5 ^a	F4	B	<1	4,0x10 ³	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	5 ^a	F6	B	<1	1,0x10 ³	<i>seb</i>	POS
<i>S. succinus</i>	1 ^a	M5	P	1,0x10 ³	4,7x10 ⁵	-	-
<i>S. vitulinus</i>	1 ^a	F2	M	1,0x10 ³	2,5x10 ⁵	-	-
<i>S. vitulinus</i>	1 ^a	M6	P	<1	2,4x10 ⁵	-	-
<i>S. vitulinus</i>	2 ^a	F6	M	<1	2,8x10 ⁶	-	-
<i>S. vitulinus</i>	5 ^a	F1	J	2,0x10 ²	2,7x10 ⁶	-	-
<i>S. vitulinus</i>	6 ^a	F1	E	<1	7,7x10 ³	-	-
<i>S. vitulinus</i>	6 ^a	M6	C	<1	2,6x10 ⁴	-	POS
<i>S. warneri</i>	3 ^a	M5	D	7,6x10 ³	2,4x10 ⁶	-	POS

(I) Resultado positivo para a presença do gene *blaZ*.