

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

BRENO BEZERRA ARAGÃO

**Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de resistência aos
 β -lactâmicos e codificadores de enterotoxinas em queijo coalho artesanal
elaborado com leite de cabra**

Recife

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

BRENO BEZERRA ARAGÃO

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de resistência aos β -lactâmicos e codificadores de enterotoxinas em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia na de Linha de Microbiologia Aplicada.

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

A659p Aragão, Breno Bezerra
Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de resistência aos β -lactâmicos e codificadores de enterotoxinas em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra / Breno Bezerra Aragão. – 2018.
74 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Coorientador: Rodolfo de Moreas Peixoto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Caprino 2. *blaZ* 3. *mecA* 4. microbiologia de alimentos I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Peixoto, Rodolfo de Moreas, coorient. III. Título

CDD 636.089

Breno Bezerra Aragão

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e genes de resistência aos β -lactâmicos e codificadores de enterotoxinas em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

APROVADO em 21 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE
(Orientador)

Prof. Dr. Rodolfo de Moreas Peixoto
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano
(Membro Titular)

Dra. Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE
(Membro Titular)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todas as coisas que me concedeu tudo que passei, tudo que amei e tudo que tenho.

Aos meus pais Manoel Aragão e Ducinea Maria, pela educação, por tudo de bom que fizeram por mim, por todas as vezes que orarão e torceram por mim. Obrigada por tudo.

Em especial ao meu pai, exemplo de homem, exemplo de pai e exemplo de profissional, muito me ensinou e muito me fez ser o que sou.

A minha irmã, Júlia Aragão, pela amizade, coragem e companheirismo ao longo de nossas vidas.

A minha amiga e esposa Sabrina Cândido, por sempre estar ao meu lado, por me fazer um ser melhor, por me enfrentar, por sempre querer meu bem e principalmente pelo exemplo de bondade, coragem e por tornar minha vida mais feliz.

A Edmilson Trajano, que me ensinou que tudo na vida é formado por fases, escolha e por mais triste que a realidade seja, temos motivos para sorrir e lembrar das nossas histórias com muita alegria.

Agradeço a Sofi, Margo e Jubileu por me ajudarem a ser uma pessoa melhor e entender um pouco mais sobre o amor.

A Bruno, meu querido amigo de infância, por tudo que me proporcionou na vida e pelo companheirismo ao longo das nossas vidas.

Aos meus amados amigos de Venturosa, em especial Ednaldo, Valdo e Haroldo, por tudo que fizeram por mim, pelas risadas e por fazerem parte da minha vida.

Ao professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota por tudo que fez por mim, pela oportunidade que me foi dada, pelos aperreios proporcionados e mais ainda pela amizade e carinho existente ao longo dos anos.

A José Givanildo pelo esforço que fez para me ajudar durante o processamento das minhas amostras, pelos sufocos que passamos e pela amizade e por tudo que me propocionou.

Aos meus companheiros de amigos de Recife, pelo companheirismo durante o mestrado, pelas conversas, brincadeiras, crescimento profissional e pessoal.

A Raylson Oliveira (Ray), por toda a simplicidade, carinho e amizade formada nesses 12 meses de convivência e de muitos esforços que fizemos.

Ao professor Dr. Wilton Junior Pinheiro, pela amizade, respeito e por toda ajuda que me foi fornecida durante esta fase.

Ao professor Dr. Rodolfo Peixoto pela co-orientação e apoio fornecidos a mim.

Aos colegas e amigos de laboratório Júnior Mário, Marcus Falcão, André Santos, Renata Moraes, Erika Samiko e Pedro Paulo por toda a ajuda que me deram, pelo respeito, paciência e momentos vividos.

A todos do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da DMV-UFRPE que contribuíram de forma positiva no meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os funcionários terceirizados que nos garantiram serviços tão importantes quanto qualquer outro. Em especial a dona Vera, Josi, Wilma, Cleide e Keyla, pelo respeito, carinho, consideração e pelos ensinamentos.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Respeito e Gratidão a todos!

Resumo: Objetivou-se avaliar o nível de contaminação e pesquisar genes codificadores para resistência a betalactâmicos e de enterotoxinas estafilocócicas em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho artesanal produzido com leite de cabra no estado de Pernambuco. O método de análise microbiológica utilizado foi de acordo com a Instrução Normativa nº 62/2003 do MAPA. Observou-se o crescimento de colônias características (típicas e atípicas) de *S. aureus* em ágar Baird Parker em 100,0% das amostras e a contagem de bactérias deste gênero variou de $7,0 \times 10^3$ a $8,6 \times 10^6$ UFC/g. Todas as amostras tiveram valores de UFC/g acima do máximo exigido pela Resolução-RDC nº12/2001 da ANVISA. Não houve detecção de nenhum dos genes codificadores de enterotoxina estafilocócica pesquisado. Quanto aos genes de resistência, o gene *blaZ* foi detectado em 42,6% dos isolados de *S. aureus* e o gene *mecA* não foi detectado. Na Concentração Inibitória Mínima, 7,4% dos isolados foram resistentes para oxacilina. A contaminação deste tipo de queijo pode estar associada a fatores de manejo dos animais, falhas na cadeia produtiva, falta de cuidados básicos nas boas práticas de fabricação no processo de elaboração dos queijos. O alto grau de contaminação do queijo coalho indica a necessidade de melhorar a assistência aos produtores, aumentar a fiscalização dos estabelecimentos comerciais e a realização de mais estudos microbiológicos sobre qualidade dos queijos coalho caprino comercializados em Pernambuco.

Palavras-chave: caprinos, *blaZ*, *mecA*, microbiologia de alimentos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the level of contamination and to investigate coding genes for resistance to betalactam and staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal curd cheese produced with goat's milk in the state of Pernambuco. The method of microbiological analysis used was in accordance with Normative Instruction 62/2003 of MAPA. The growth of characteristic (typical and atypical) colonies of *S. aureus* in Baird Parker agar was observed in 100.0% of the samples and the bacterial count of this genus ranged from 7.0×10^3 to 8.6×10^6 CFU/g. All samples had values of CFU/g above the maximum required by Resolution-RDC nº12/2001 – ANVISA. There was no detection of any of the staphylococcal enterotoxin encoding genes investigated. Regarding resistance genes, the *blaZ* gene was detected in 42.6% of *S. aureus* isolates and the *mecA* gene was not detected. At the Minimum Inhibitory Concentration, 7.4% of the isolates were resistant to oxacillin. The contamination of this type of cheese can be associated to factors of animal handling, failures in the production chain, lack of basic care in the good manufacturing practices in the process of elaboration of the cheeses. The high degree of contamination of the rennet cheese indicates the need to improve the assistance to producers, to increase the inspection of commercial establishments and to carry out further microbiological studies on the quality of goat cheese in Pernambuco.

Key words: goats, *blaZ*, *mecA*, food microbiology.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 2.1 Leite Caprino e Seus Derivados | 6 |
| 2.2 Doenças Transmitidas por Alimentos | 8 |
| 2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| 2.4 Características Genéticas dos Genes Codificadores de Enterotoxinas | 12 |
| 2.4.1 Gene Codificador <i>sea</i> | 12 |
| 2.4.2 Gene Codificador <i>seb</i> | 13 |
| 2.4.3 Gene Codificador <i>sec</i> | 13 |
| 2.4.4 Gene Codificador <i>sed</i> | 13 |
| 2.4.5 Gene Codificador <i>see</i> | 13 |
| 2.4.6 Gene Codificador <i>tst</i> | 14 |
| 2.5 Enterotoxinas Estafilocócicas | 14 |
| 2.6 Genes de Resistência à Antimicrobianos: <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> | 16 |
| 3. OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 Objetivo Geral | 19 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 19 |
| 4. REFERÊNCIAS | 20 |
| 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS | 34 |
| 5.1 Artigo 1 | 34 |
| Resumo | 35 |
| Introdução | 36 |
| Material e Métodos | 36 |
| Resultados | 40 |
| Discussão | 42 |
| Conclusão | 42 |
| Referência | 45 |
| 5.2 Artigo 2 | 50 |
| Resumo | 51 |
| Introdução | 51 |
| Material e Métodos | 52 |
| Resultados | 57 |
| Discussão | 58 |
| Conclusão | 60 |
| Referência | 61 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 66 |

Lista de Siglas e Abreviaturas

BPF - Boas Práticas de Fabricação

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DTAs - Doenças Transmitidas por Alimentos

EE - Enterotoxinas Estafilocócicas

EEA - Enterotoxina estafilocócica A

EEB - Enterotoxina estafilocócica B

EEC - Enterotoxina estafilocócica C

EED - Enterotoxina estafilocócica D

EEE - Enterotoxina estafilocócica E

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FDA - United States Food and Drug Administration

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

PCR - Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase

SCP- *Staphylococcus coagulase* positiva

SEA - Gene codificador da enterotoxina estafilocócica A

SEB - Gene codificador da enterotoxina estafilocócica B

SEC - Gene codificador da enterotoxina estafilocócica C

SED - Gene codificador da enterotoxina estafilocócica D

SEE - Gene codificador da enterotoxina estafilocócica E

TST-1 - Gene codificador da Toxina-1 da Síndrome do choque Tóxico

TSST-1 - Toxina-1 da Síndrome do choque Tóxico

UFC/g - Unidades Formadoras de Colônias por Grama

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número de amostras coletadas em estabelecimentos comerciais e seus respectivos municípios amostrados (ARTIGO 1)..... | 38 |
| Tabela 2. Contagens de UFC/g em ágar Baird-Parker de colônias típicas e atípicas de <i>Staphylococcus aureus</i> nos diferentes municípios e estabelecimentos do Estado de Pernambuco (ARTIGO 1)..... | 40 |
| Tabela 3. Frequência de estabelecimentos com queijo coalho caprino contaminados por <i>S. aureus</i> (confirmação: gene <i>nuc</i>) comercializados no Estado de Pernambuco (ARTIGO 1)..... | 41 |
| Tabela 4. Resultado da análise de concordância entre os testes de PCR e coagulase das colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de queijo coalho caprino, Pernambuco, 2017 (ARTIGO 1)..... | 42 |

Lista de Imagem

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribuição de amostras por municípios amostrados no estado de Pernambuco (ARTIGO 2)..... | 53 |
|---|----|

1. INTRODUÇÃO

A espécie caprina está distribuída em todos os continentes do planeta, sendo que as maiores concentrações estão nos países em desenvolvimento. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento, em um levantamento realizado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura em 2014, o rebanho mundial de caprinos é de aproximadamente um bilhão de cabeças (CONAB, 2016). Dentre os maiores produtores estão a China com 19,00% do rebanho mundial, Índia com 13,00%, Nigéria com 7,00%, Paquistão com 6,60% e Bangladesh (5,60%) (CONAB, 2016). No *ranking* mundial, o Brasil ocupa a 22ª colocação.

O efetivo nacional de caprinos, de acordo com o censo realizado em 2015 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foi de 9,61 milhões de cabeças, com um aumento de 8,6% em relação a 2014. Em termos regionais, 92,7% deste efetivo está na Região Nordeste, onde houve um aumento de 9,9% do rebanho em relação a 2014. Os estados da Bahia e Pernambuco detêm mais de 50% do efetivo nacional, Bahia com 27,4% e Pernambuco com 25,3% do total, respectivamente, seguidos por Piauí (12,8%) e Ceará (11,6%), representando 83,3% do efetivo nacional da espécie (IBGE, 2015).

De acordo com a Caprilat (2013), a expansão da caprinocultura leiteira deve-se ao fato da introdução do leite caprino nos programas assistenciais dos governos estaduais brasileiros, com destaque para a região Nordeste que favoreceu o incremento na produção do leite de cabra e seus derivados. Apesar da importância da caprinocultura leiteira na região Nordeste, sua produção possui base familiar sem tecnificação e cuidados higiênico-sanitários adequados (CORREIA et al., 2001), fato que representa risco ao consumo, uma vez que o leite de cabra e seus derivados podem veicular diversos microrganismos patogênicos (RALL et al., 2008; XING et al., 2016).

O risco de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é maior quando se trata de leite caprino, pois normalmente o leite utilizado para elaboração de queijos não sofre tratamento térmico prévio, aumentando o risco de veiculação

de microrganismos patogênicos (DE BUYSER et al., 1985; RALL et al., 2008). Dentre esses agentes destaca-se *Staphylococcus aureus* (ZECCONI e HAHN, 2000), que possui importância na epidemiologia das DTAs em decorrência do potencial risco zoonótico devido ao risco de produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE), contaminando os alimentos e podendo causar gastroenterites alimentares (WANG et al., 2012; XING et al., 2016).

A produção de EE é considerada a principal causa das intoxicações de origem bacteriana no homem, sendo relatada em diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos (CLIVER, 1994). Esta produção está associada às cepas de estafilococos produtoras de coagulase que apresentam propriedades bioquímicas de fermentação de carboidratos e produção de fosfatase, lisozima, lipases, DNAse, entre outras (JAY, 2005). Já foram descritas diversas EE, sendo os tipos EEA, EEB, EEC, EED e EEE de maior relevância para os alimentos, em virtude da sua maior ocorrência nos casos de intoxicações alimentares (BLAIOTTA et al., 2004; OMOE et al., 2005).

Além das EE, algumas cepas do gênero *Staphylococcus* podem produzir a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (TODD et al., 1978; SPANU et al., 2012). A TSST-1 é responsável por uma doença sistêmica de caráter agudo, com febre alta, hipotensão e envolvimento de três ou mais órgãos sistêmicos (CHESNEY, 1989). Devido à importância das EE e TSST-1 e o impacto na saúde pública, vários estudos já foram realizados para detecção de genes toxigênicos em isolados de *S. aureus*, procedentes de amostras de leite de cabra e seus derivados (ORDEN et al. 1992; SCHERRER et al. 2004).

S. aureus além de causar surtos de intoxicação alimentar (JOHLER et al. 2015), pode ser responsável por infecções persistentes de difícil tratamento devido a fatores de virulência e resistência a antimicrobianos (FRANKLIN, 2003; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). A resistência pode ser conferida por genes específicos, como o gene *blaZ*, que confere ao *S. aureus* resistência à penicilina (NOGUCHI et al., 2002) e o gene *mecA* que confere as cepas de *S. aureus* meticilina resistente – MRSA, conferindo resistência a praticamente todos os β -lactâmicos, cepas estas que constituem um risco à saúde humana e

animal, e podem ser veiculados pelo leite de cabra e seus derivados (XING et al., 2016; KLIMEŠOVÁ et al., 2017).

Apesar da importância da caprinocultura na região Nordeste do Brasil não há estudos sobre a detecção de genes codificadores de EE, TSST-1 e de resistência (*blaZ* e *mecA*) em *S. aureus* de queijo coalho artesanal elaborado com leite caprino nesta região. Desta forma, objetivou-se neste estudo avaliar o nível de contaminação por *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo coalho artesanal produzido com leite de cabra no estado de Pernambuco, além de detectar genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas do tipo A, B, C, D, E, Toxina da Síndrome do Choque Tóxico e os genes *blaZ* e *mecA* associados à resistência aos betalactâmicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite Caprino e Seus Derivados

O leite de cabra é definido pela Instrução Normativa de nº 37/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como um produto originado de ordenha higiênica, completa e ininterrupta de cabras saudáveis, bem alimentadas e em descanso. As características sensoriais do leite de cabra são: cor branca, sabor e odor especiais, mas não desagradáveis (BRASIL, 2000). No Brasil, a identidade e qualidade do leite de cabra são regulamentadas pela Instrução normativa de nº 37/2000 (BRASIL, 2000) que fixa as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano. Ainda, determina teores mínimos de proteína (2,8%), lactose (4,3%) e cinzas (0,7%) e acidez podendo variar entre 0,13 a 0,18%.

O regulamento de padrões de qualidade de leite de cabra é de extrema importância, já que a partir do leite caprino obtido pela ordenha, é possível beneficiá-lo e obter diversos derivados como iogurtes, bebidas lácteas, doces e queijo, por meio de técnicas de elaboração simples e acessíveis aos pequenos caprinocultores, alternativa esta para o aumento do consumo de produtos e agregação de valor como estímulo à produção (SANTOS et al., 2011).

A produção de leite de cabra e o aumento de sua demanda pode ser caracterizada por alguns aspectos gerais, sendo considerada uma importante fonte de obtenção de carne, leite e derivados para população de áreas rurais de baixa renda. Existe grande procura do leite e derivados nos países desenvolvidos como de alto padrão de qualidade (produtos *gourmets*), tais como os queijos finos elaborados com leite de cabra; além destes o leite caprino é tido como uma importante fonte nutricional, e também é considerado um produto medicinal para aqueles que sofrem de alergia ao leite de vaca e/ou outras patologias gastrointestinais (HAENLEIN, 2004).

O leite caprino quando comparado com o leite bovino, apresenta na sua composição o predomínio de β -caseína, K-caseína e menor teor de α S1-

caseína; ainda, em relação à composição, o lactosoro caprino possui uma menor quantidade de albumina sérica e lactoalbumina; estes teores são uma vantagem para pessoas que sofrem com processos alérgicos ao leite de vaca (BUSINCO e BELLANTI, 1993). Estas características físico-químicas tornam o leite caprino e seus derivados, produtos de elevada digestibilidade e para fins terapêuticos (BUENO, 2005), sendo considerados hipoalergênicos (EL-AGAMY, 2007).

O leite caprino e seus derivados, além de serem considerados alimentos de grande importância nutricional e terapêutica para os seres humanos (RIBEIRO e RIBEIRO 2010; SLAČANAC et al., 2010), ainda exercem grande importância econômica (ANDRADE et al., 2012). Apesar da relevância da caprinocultura leiteira e de seus derivados, existem alguns entraves neste segmento, uma vez que é desenvolvido de forma rudimentar e vinculado à produção familiar, baixa tecnificação, pouca eficiência dos sistemas de produção praticados, bem como, da inexistência de tecnologias de processamento e elaboração dos produtos derivados (QUEIROGA et al., 2013).

Considerando a importância econômica e o impacto à saúde pública que as falhas de elaboração de queijos artesanais no estado de Pernambuco poderiam gerar, no ano de 1992 foi criado o Decreto de nº 15.839 que posteriormente foi alterado no ano de 2007 pela Lei nº 13.376. A Lei estadual de nº 13.376 visa a inocuidade dos queijos artesanais, bem como o seu modo de elaboração e exige condições higiênico-sanitárias mínimas de elaboração e segurança microbiológica (ALEPE LEGIS, 2007).

As falhas no sistema de produção da caprinocultura leiteira, além de causar perdas econômicas (CORDEIRO, 2006) é um sério problema para Saúde Pública, pois estes podem constituir um risco à saúde do consumidor (SILVA et al., 2015), uma vez que, o leite caprino e seus derivados podem veicular microrganismos patogênicos e causar surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (STEWART, 2005; RALL et al., 2008; XING et al., 2016; KLIMEŠOVÁ et al., 2017).

2.2 Doenças Transmitidas por Alimentos

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são definidas pela Organização Mundial da Saúde como "afecções de origem infecciosa ou tóxica causadas pelo consumo de alimentos ou água" (WHO, 2017). Atualmente existe uma grande preocupação por parte dos consumidores e de órgãos fiscalizadores referentes à qualidade e segurança dos alimentos; neste sentido as DTAs possuem grande relevância ao serem tratadas como um sério problema para a saúde pública (SANTANA et al., 2010).

Nos últimos anos as DTAs tiveram um grande destaque estando muitas vezes associadas a fatores de nível econômico, processo de globalização do comércio de alimentos, aumento da urbanização (ABREU et al., 2001), além de mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores, que estão dando preferência a alimentos frescos ou *in natura*, prontos ou semi-prontos e por realizar um maior número de refeições fora do domicílio (SAHYON, 2002; TOMASI e SPAZZIANI, 2008).

São diversas as causas de contaminação dos alimentos e desta forma a Organização Mundial de Saúde tem salientado a importância da inocuidade e o risco de danos à saúde que os alimentos contaminados podem causar (JOOB e WIWANITKIT, 2015). No Brasil, de acordo com o levantamento epidemiológico sobre a frequência de surtos de DTAs, no ano de 2013 foram notificados 861 surtos que resultaram em 17.455 doentes; no ano seguinte foram registrados 886 surtos com 15.700 doentes. No levantamento realizado em 2016, o número de surtos notificados foi de 543 surtos e 9.907 doentes, sendo a região Sudeste a que possui a maior frequência de notificação de surtos no país (BRASIL, 2017).

Em um levantamento realizado pela Secretaria de Saúde de Pernambuco (2017) entre os anos de 2002 e 2011 foram confirmados 551 surtos de DTAs, que ocasionaram aproximadamente 10.029 doentes e 14 óbitos. Em 2012 foram registrados 59 surtos que resultaram em 1.135 doentes. A frequência dos casos de surtos de DTAs foi mais frequente na 1ª Gerência Regional de Saúde (abrange os municípios da região Metropolitana

do Recife e a Ilha de Fernando de Noronha) com aproximadamente 82,2% (SES, 2017).

Dos casos notificados em Pernambuco, a maior parte dos surtos notificados (36,3%) ocorreu em estabelecimentos comerciais de alimentação (lanchonetes, restaurantes, bares e padarias). Em seguida, vêm os casos ocorridos em residências domésticas com frequência de 28,1% dos casos (SES, 2017).

De acordo com a literatura, existe mais de 250 tipos de DTAs descritas, como por exemplo: botulismo, salmonelose, cólera, intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas, entre outras, as quais são cosmopolitas, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento (LE LOIR et al., 2003). Os alimentos de maneira geral estão suscetíveis às contaminações por diferentes agentes etiológicos, que podem causar doenças devido a ações do seu próprio desenvolvimento ou pela ação de toxinas (STAMFORD et al., 2006).

Dentre as afecções causadas pelas DTAs, é importante ressaltar a diferença existente entre a infecção alimentar e a intoxicação alimentar. A infecção alimentar é um quadro caracterizado pela ingestão de microrganismos viáveis no alimento, em quantidade suficiente para causar o aparecimento de sintomas após passarem pelas barreias protetoras do organismo humano. Na intoxicação alimentar, os microrganismos produzem toxinas no alimento que ao ser ingerido resultará nos sintomas (POULSEN, 2015).

Os distúrbios causados por essas afecções podem se apresentar de diversas formas, caracterizando-se como uma síndrome onde frequentemente estão presentes os sintomas de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia e febre. A ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes patogênicos podem também causar doenças extra intestinais envolvendo órgãos como os rins e o fígado, assim como o sistema nervoso central (BRASIL, 2017).

Dentre os microrganismos causadores de DTAs destaca-se *Staphylococcus aureus* (KOUAMÉ-SINA et al., 2012; NJAGE et al., 2013). Esse

microrganismo é considerado a principal causa de intoxicações alimentares e da Síndrome do choque tóxico em todo o Mundo devido à produção EE e TSST-1 (OLIVER et al., 2009; DINGES et al., 2000; LETERTRE et al., 2003a; TONG et al., 2015). A alta frequência de *S. aureus* em alimentos tem uma importante associação com a manipulação e condições higiênicas inadequadas na obtenção e sua elaboração, bem como nas etapas de transporte e refrigeração inadequada (ARGUDIN et al., 2010). Os alimentos mais incriminados nos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são as carnes de frango, ovos de galinha de capoeira, saladas, produtos de panificação (doces, bolos confeitados), sanduíches (WIENEKE et al., 1993; TAMARAPU et al., 2001) e em especial os produtos lácteos (ZWEIFEL et al., 2006; OLIVER et al., 2009).

Dentre os alimentos, os produtos lácteos são mais suscetíveis à contaminação por *S. aureus* e na Europa foram responsáveis por 5% dos surtos ocorridos (BIANCHI et al., 2014). Os queijos artesanais elaborados com leite caprino detêm grande importância nesse aspecto, pois normalmente não sofrem tratamento térmico, o que eleva ao risco de contaminação por microrganismos patogênicos que ocasionalmente podem causar surtos de intoxicação alimentar; os queijos artesanais caprinos já foram incriminados em surtos de intoxicação alimentar (DE BUYSER et al., 1985; WIENEKE e GILBERT, 1987; JOHLER et al., 2015).

2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertence à família *Staphylococcaceae* que possui mais de 52 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2018). É uma bactéria que se apresenta em forma de cocos, com tamanho variando de 0,5 a 1,5 micrômetros de diâmetro. É uma bactéria Gram-positivo e pode se apresentar em apenas uma célula, em pares ou tétrades em forma que lembra o cacho de uva; são anaeróbios facultativos, crescendo melhor em ambientes de aerobiose, é catalase positivo, imóveis e não possuem a capacidade de esporular (BERGDOLL, 1989; KLOSS e SCHLEIFER, 1984).

De modo geral, são microrganismos mesófilos típicos, com temperatura ótima de crescimento de 35°C, porém podem crescer em temperatura variável entre 7 a 47,8°C. O potencial de Hidrogênio ideal é de 7,0 e 7,5, sendo resistente às variações de 4,2 a 9,3 (KLOSS e SCHLEIFER, 1984; FDA, 2012). Em alimentos, *S. aureus* desenvolve-se bem até naqueles que possuem atividade de água de 0,83W, sendo considerado o valor ótimo de 0,99W (BERGDOLL, 1990; FDA, 2012). É considerado também um microrganismo halotolerante, crescendo em alimentos que contêm até 20% de NaCl e são bactérias termolábeis, sendo inativadas a temperaturas superiores a 60°C por três minutos (BERGDOLL, 1989; FDA, 2012).

Sua distribuição é ampla na natureza, sendo resistente à dessecação e ao frio e pode permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. *S. aureus* pode infectar diversos animais, causando enfermidade ou não. A infecção por *S. aureus* em bovinos leiteiros é mais frequente quando comparada aos ovinos e caprinos (MORONI et al., 2005), porém podem veicular o agente em casos de mastite em cabras leiteiras (STEWART, 2005).

No homem, a prevalência de *S. aureus* pode variar de 40% (BANNERMAN, 2003) a 60% (CASSETTARI et al., 2005) em sítios anatômicos, como no conduto nasal, na garganta, na superfície da pele, sendo mais frequente nas mãos, braços, rosto e feridas (JAY, 1993; KLUYTMANS e WERTHEIM, 2005; ARGUDIN et al., 2010). Nesse sentido, *S. aureus* pode ser um importante indicador de higiene pessoal e de avaliação de programas de sanitização de indústrias lácteas (PALES et al., 2005), devido ao potencial de formação de biofilmes, elevando o risco de transmissão e contaminação de alimentos (AKBAS et al., 2015).

Estudos demonstraram que uma das vias mais frequentes de transmissão e contaminação de alimentos por *S. aureus* é via manipulador, além de indivíduos doentes ou portadores assintomáticos (BRYAN, 1988; CARMO et al., 2003; ARGUDIN et al., 2010). Esses fatores, aliados às falhas higiênico-sanitárias no processamento e manipulação, podem contaminar os alimentos e dar origem a surtos de DTAs (GOMES e GALLO, 1995; CARMO et al., 2003; BECKER et al., 2007).

S. aureus é considerado uma das bactérias mais estudadas, devido a sua importância na epidemiologia da mastite em rebanhos leiteiros, além da considerável perda de dias úteis e produtividade, custos gerados com atendimento médico e hospitalar (BALABAN e RASOOLY 2000), perdas econômicas para a indústria alimentícia (RIBEIRO et al., 2003). *S. aureus* é conhecido como um patógeno de importância mundial para saúde pública, em decorrência da sua resistência a antimicrobianos (JAMALI et al., 2015) e produção de EE (RAHBAR SAADAT et al., 2014; TONG et al., 2015).

2.4 Características Genéticas dos Genes Codificadores de Enterotoxinas

Os genes codificadores de enterotoxinas conferem a *S. aureus* a capacidade de produção de enterotoxinas que podem causar quadros de intoxicação alimentar quando ingeridos (HENNEKINNE et al., 2012). A expressão desses genes (produção das EE) está associada a diversos fatores, como temperatura (TUTSUURA e MURATA, 2013), número de células viáveis, concentração do microrganismo, concentração de sal, pH (BALABAN e RASOOLY, 2001; BRASCA et al., 2005), além da competição da microbiota presente (NECIDOVÁ et al., 2009).

O entendimento aprofundado dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas se deu em 1984, quando foi descrito a partir da clonagem da Enterotoxina Estafilocócica A (EEA), por meio da técnica de transferência de DNA cromossomal de *S. aureus* enterotoxigênico portador de genes codificadores de enterotoxina (BETLEY et al., 1984).

2.4.1 Gene Codificador *sea*

O gene *sea* quando expresso confere a *S. aureus* a capacidade de produção da EEA. São carreados em profagos (BALABAN e RASOOLY, 2000), sendo composto por 771 pares de bases nucleotídicas; é responsável pela codificação do precursor de enterotoxina A, composta por 257 resíduos de aminoácidos (BETLEY e MEKALANOS, 1988). Esta molécula é processada na base de 24 resíduos N-terminais que dará origem a partícula ativa (TREMAINE et al., 1993).

2.4.2 Gene Codificador *seb*

O gene *seb* é outro tipo de gene codificador de EE e sua origem pode ser cromossomal (SHAFER e IANDOLO, 1978) e/ou plasmideal (SHALITA et al., 1977). O gene *seb* é composto por 798 nucleotídeos que quando expresso produzirá uma proteína precursora da EEB formada por 266 aminoácidos (JONES e KHAN, 1986).

2.4.3 Gene Codificador *sec*

O gene *sec* possui sua origem na região cromossomal conservada e quando é expresso pode originar os três subtipos de EE: (EEC₁, EEC₂ e EEC₃), sendo distinguidas antigenicamente (MARRACK e KAPPLER, 1990). Apesar das diferenças antigênicas dos três subtipos de EE, exibem uma homologia de 97% na sequência de aminoácidos (NAGARAJ et al., 2016). O gene *sec* é composto por 801 pares de bases, estes formam três regiões: *sec*₁, *sec*₂ e *sec*₃ que ao serem expressas darão origem a EEC₁, EEC₂ e EEC₃ respectivamente. A região *sec*₁ ao ser expressa formará uma proteína precursora da EEC₁ composta por de 266 aminoácidos, ao final do processamento no retículo plasmático rugoso, a molécula finalizada será composta por 296 aminoácidos (BOHACH e SCHLIEVERT, 1987). Já a região *sec*₂, ao ser expressa produzirá a EEC₂, composta por uma molécula ativa de 255 resíduos de aminoácidos (ROBERN et al., 1975). A região *sec*₃ codifica a EEC₃, que é tida como altamente emética e sua formação é composta por 236 resíduos de aminoácidos (REISER et al., 1984).

2.4.4 Gene Codificador *sed*

O gene *sed* também possui sua origem plasmidial de 27,6 Kb denominado de π B485. Este gene é composto por 258 aminoácidos e ao passar pelo processo de expressão genética dará origem a proteína precursora da EED formada por 228 aminoácidos (BAYLES e IANDOLO, 1989).

2.4.5 Gene Codificador *see*

O gene *sea* quando expresso confere a *S. aureus* a capacidade de produção da EEE. Este gene possui sua origem cromossomal (BETLEY e

MEKALANOS, 1988), e é composto por 771 pares de base nucleotídicas; sua expressão dá origem a uma proteína precursora formada por 214 resíduos de aminoácidos (COUCH et al., 1988).

2.4.6 Gene Codificador *tst*

O gene *tst* possui sua origem cromossomal e é responsável por codificar a produção da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Este gene é formado por 708 pares de bases nucleotídicas (BLOMSTER-HAUTAMAA et al., 1986), e o gene pode ser encontrado nas ilhas de patogenicidade de cepas de *S. aureus*, podendo estar inseridos tanto na região próxima a *tyrB* (SAPI1), quanto em *trp* (SAPI2) (LINDSAY et al., 1998).

2.5 Enterotoxinas Estafilocócicas

As EE são resultantes da expressão dos genes codificadores. São importantes exotoxinas sintetizadas por *S. aureus* ao longo da fase de crescimento logarítmica ou na fase de transição do crescimento exponencial para a fase estacionária (OTERO et al., 1990; BETLEY et al., 1992) e podem causar distúrbios gastrointestinais (ZECCONI e HAHN, 2000). Para que ocorra o quadro de intoxicação alimentar basta haver a ingestão de pequena dose (BERGDOLL, 1979; ASAO et al., 2003; LARKIN et al., 2009; FDA, 2012) que pode variar de 20 a 200ng de EE (EVENSON et al., 1988; NORMANNO et al., 2007).

As EE são formadas por cadeias de proteínas simples e de baixo peso molecular de 26.000 a 30.000 daltons (SORIANO et al., 2002). São resistentes ao processo de pasteurização e não são inativadas pelos produtos originados da fermentação de outros microrganismos (LONCAREVIC et al., 2005), onde uma vez produzida, permanece no alimento mantendo sua atividade biológica (BECKER et al., 2007). Além da resistência das EE no processamento tecnológico, não são inativadas pela ação de proteases presentes no trato gastrointestinal (pepsina) (LONCAREVIC et al., 2005).

A ingestão de EE pode causar o quadro intoxicação alimentar caracterizados por vômito, náuseas, diarreia, dores abdominais, com período de incubação de uma a seis horas após a ingestão do alimento contaminado (PASSOS et al., 1996; PEREIRA et al., 1996; HENNEKINNE et al., 2012). A duração do quadro geralmente é curta (24 a 48 horas) e a recuperação do doente pode ocorrer de um a três dias (HOLMBERG e BLAKE, 1984). A intoxicação estafilocócica é branda, auto limitante, com baixa taxa de mortalidade (HOLMBERG e BLAKE, 1984), porém é considerada uma das principais intoxicações de origem bacteriana no homem, sendo relatada em diversos surtos de doenças transmissíveis por alimentos (CLIVER, 1994; BRASCA et al., 2005).

As EEs pertencem ao grupo de toxina pirogênica da família de superantígenos como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (DINGES et al., 2000), sendo esta responsável por gerar uma resposta hiperimune no hospedeiro, com proliferação de linfócitos T independentemente da especificidade do antígeno destas células (SCHLIEVERT et al., 2000; CHA et al., 2007). De acordo com o Comitê de Nomenclatura Internacional para a Nomenclatura de Superantígeno Staphylococcal (sigla em inglês INCSSN), as EEs podem ser classificadas de acordo com sua capacidade de atividade emética ou não, após a administração oral em primatas (LINA et al., 2004; OMOE et al., 2005).

De acordo com a literatura, até o momento foram descritas 23 EEs, sendo classificadas como EEs eméticas os tipos: EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI, EER, EES, EET (ARGUDIN et al., 2010; WILSON et al., 2011; HENNEKINNE et al., 2012), EEY (ONO et al., 2015). Além destas, existem as EEs não eméticas: EEJ, EEK, EEL, EEM, EEN, EEO, EEP, EEQ, EEU, EEV, EEX (ARGUDIN et al., 2010; WILSON et al., 2011; HENNEKINNE et al., 2012) e também a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico classificada inicialmente de EEF sem atividade emética (REISER et al., 1983; BERGDOLL, 1997).

Dentre as EEs citadas são consideradas como clássicas a EEA, EEB, EEC, EED e EEE. Estas são tidas como mais relevantes devido ao número elevado de casos que foram associadas aos surtos de intoxicação alimentar

(ARGUDIN et al., 2010). Em estudos foram detectadas frequências de até 95% de surtos de intoxicação alimentar causados pelas EEs A, B, C, D e E (JARRAUD et al., 1999; LETERTRE et al., 2003b; PELISSER et al., 2009).

2.6 Genes de Resistência à Antimicrobianos: *blaZ* e *mecA*

Os antibióticos são substâncias utilizadas desde a década de 1940 para tratar infecções bacterianas com expressiva eficácia clínica (AMINOV, 2010). No entanto, o uso incorreto e excessivo destas substâncias levou ao surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos, tais como cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), causadoras de graves infecções e um sério problema de saúde pública (HEDE, 2014).

As condições de multirresistência de *S. aureus* já foram relatadas em diversos estudos (NEVES et al., 2010; ABULREESH et al., 2017; LEIGUE et al., 2017). *S. aureus* é um patógeno que causa grande preocupação devido aos fatores intrínsecos de virulência (WALDVOGEL, 2000), sua capacidade de infectar uma diversidade de seres vivos e se adaptar a diferentes condições ambientais (LOWY, 1998).

De maneira geral, a resistência aos antimicrobianos está relacionada a fenômenos genéticos que estão associados à existência de genes codificadores que quando expressos, podem formar mecanismos bioquímicos de escape, impedindo a ação de substâncias (antimicrobianos). Esses mecanismos são de grande relevância para saúde pública, uma vez que sua transmissão entre linhagens interespecíficas pode ocorrer via consumo de alimentos contaminados por agentes patogênicos, intensificando a disseminação de genes que possam conferir a resistência (STÖHR e WEGENER, 2001).

Assim, as bactérias portadoras de genes de resistência aumentam a possibilidade de resistir à ação de um antibiótico e também de sua disseminação, justificando-se a importância de estudos epidemiológicos sobre estes microrganismos e sua frequência (DROPA, 2006). A resistência aos antibióticos muitas vezes possui origens genéticas diferentes, a exemplo, os

genes codificadores de resistência *blaZ* (DIAS et al., 2015) e o *mecA* (KLIMEŠOVÁ et al., 2017), responsáveis pela resistência às penicilinas em cepas de *S. aureus* que os possui.

O gene *blaZ* pode estar localizado no cromossomo ou no plasmídeo (LYON e SKURRAY, 1987) e quando expresso, é responsável pela produção de beta-lactamases que inativam a penicilina por hidrólização do anel beta-lactâmico (DIAS et al., 2015). O gene *blaZ* é regulado por dois reguladores, o anti-repressor *blaR1* e o repressor *blaI* (LOWY, 2003); quando a bactéria é exposta a uma droga β -lactâmica, a proteína de sensor de transdutor de sinal promove a clivagem do gene repressor (*blaI*) e assim por meio da *blaR1*, ocorre a transcrição do *blaZ* (ZHANG et al., 2001).

Outro gene codificador de resistência a antimicrobianos é o *mecA* que está localizado na região genômica denominada *Cromossomo Cassete Staphylococcus mec* (SCCmec) (KATAYAMA et al., 2000). A expressão do gene *mecA* está associada a reguladores homólogos. O *mecl* e *mecR1*, regularam a expressão do *mecA* aos antibióticos β -lactâmicos de forma semelhante ao *blaZ* após a exposição à penicilina (ARCHER e BOSILEVAC, 2001).

O *mecA* confere a *S. aureus* resistência a praticamente todos β -lactâmicos; quando é expresso produz uma proteína alternativa *penicillin binding protein 2a* (PBP2a) de 78 kDa, com baixa afinidade aos β -lactâmicos (MEHROTRA et al., 2000). A PBP2a é uma molécula refratária à ação de β -lactâmicos, sendo capaz de assumir as funções das PBPs típicas de *S. aureus* na presença de antibiótico β -lactâmico. A PBP2a passa por uma alteração conformacional substancial no momento de interação com os antibióticos β -lactâmicos e este mecanismo permite uma ligação cruzada do antibiótico com a estrutura da parede celular bacteriana, não havendo interferência no metabolismo bacteriano (GUIGNARD et al., 2005).

S. aureus portadores do gene *mecA* são denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), as cepas MRSA devem ser tratadas

como microrganismos resistentes aos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos em geral. O diagnóstico laboratorial pode ser pela detecção do gene *mecA* (genotípica) (SHORE et al., 2011) e também pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM) (teste fenotípico), sendo utilizada a oxacilina para avaliar a resistência à metilina (CLSI, 2015).

As cepas MRSA são responsáveis por diversos tipos de infecções em seres humanos e em animais (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011; PETINAKI e SPILIOPOULOU, 2012). As mesmas estão cada vez mais disseminadas em ambientes e infecções hospitalares em humanos (sigla, HA-MRSA, do inglês: *hospital-acquired*) em todo o mundo (BARDIAU et al., 2013). As MRSA também se destacam pelas infecções não hospitalares (CA-MRSA, *community-acquired*) e em animais de produção (LA-MRSA, *livestock-associated*) (HARRISON et al. 2017).

As cepas de MRSA já foram relatadas também como um risco à saúde pública por meio de sua veiculação por alimentos. O isolamento destas cepas já foi relatado em carne bovina (BEILEI et al. 2017), leite cru, queijo, carne picada e carne de frango (CAN et al. 2017) e produtos industrializados com carne de peru (BENINATI et al., 2015). O leite e os queijos elaborados com leite caprino também possuem grande relevância para saúde pública na veiculação de MRSA e os mesmos já foram relatados em vários estudos (STASTKOVA et al., 2009; BASANISI et al., 2016; GANAI et al., 2016; OBAIDAT et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o nível de contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijo coalho artesanal produzido com leite de cabra no estado de Pernambuco, quanto à ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, da toxina da síndrome do choque tóxico e dos genes de resistência *blaZ* e *mecA*.

3.2 Específicos

- Quantificar as Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) de *Staphylococcus* spp. em queijos coalho artesanais elaborados com leite caprino no estado de Pernambuco.
- Identificar *Staphylococcus aureus* em queijos coalho artesanais elaborados com leite caprino no estado de Pernambuco.
- Avaliar a concordância entre os resultados obtidos nos diferentes métodos de diagnósticos empregados na detecção de *S. aureus*.
- Detectar a frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus*.
- Detectar a frequência de genes codificadores de resistência a antimicrobianos *blaZ* e *mecA*.
- Avaliar a resistência fenotípica à oxacilina dos isolados de *S. aureus*.

4. REFERÊNCIAS

ABREU, E. S.; VIANA, I. C.; MORENO, R. B.; TORRES, E. A. F. S. Alimentação mundial - uma reflexão sobre a história. **Saúde e Sociedade**. v.10, n.2, p.3-14, 2001.

ABULREESH, H. H.; ORGANJI, S. R.; OSMAN, G. E. H.; ELBANNA, K.; ALMALKI, M. H. K.; AHMAD, I. Prevalence of antibiotic resistance and virulence factors encoding genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Saudi Arabia. **Clinical Epidemiology and Global Health**. v.5 p.196-202, 2017.

ARCHER, G. L.; BOSILEVAC, J. M. Microbiology. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. **Science**. v.291, p.1915-1916, 2001.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**. v.1, n.134, 2010.

ANDRADE, N. P. C.; PEIXOTO, R. M.; NOGUEIRA, D. M.; KREWER, C. C.; COSTA, M. M. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa de um rebanho leiteiro caprino em Santa Maria da Boa Vista – PE. **Medicina Veterinária**. v.6, p.1-6, 2012.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**. v.2, p.1751-1774, 2010.

AKBAS, M. Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. **International Journal of Food Science & Technology**. v.50, p.1666-1672, 2015.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**. v.130, n.1, p.33-40, 2003.

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

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **International Journal of Food Microbiology**. v.64, p.33-40, 2001.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual Clinical Microbiology**. 8^o Ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1, p.384-404.

BARDIAU, M.; YAMAZAKI, K. DUPREZ, J.N.; TAMINIAU, B. MAINIL, J.G.; OTE, I. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**. v.57, n.3, p.181-186, 2013.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and Molecular Analyses of the Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin D. **Journal Of Bacteriology**. v.171, n.9, p.4799-4806, 1989.

BASANISI, M. G.; NOBILI, G.; LA BELLA, G.; RUSSO, R.; SPANO, G.; NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**. v.135, p.17-19, 2016.

BECKER, H.; BÜRK, C.; MÄRTLBAUER, E. Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**. v.2, p.171-189, 2007.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal infections. **Food-borne Infections and Intoxications**, 2^o Ed., New York: Academic Press, 1979, p.443-494.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.) **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, cap.11, p.463-523.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D. O. (Ed.) **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press Inc., 1990, cap.5, p.85-106.

BERGDOLL, M. S. Toxic shock syndrome. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v.3, n.1, p.6-21, 1997.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemical Immunology**. v.55, p.1-35, 1992.

BIANCHI, D. M.; GALLINA, S.; BELLIO, A.; CHIESA, F.; CIVERA, T.; DECASTELLI, L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairyproducts in Italy. **Letters in Applied Microbiology**. v.58, p.190-196, 2014.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seg* and *sei* in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**. v.97, n.4, p.719-730, 2004.

BEILEI, G.; MUKHERJEE, SAMPA.; HSU, CHIH-HAO; DAVIS, J. A.; TRAN, T. T. T.; YANG, Q.; ABBOTT, J. W.; AYERS, S. L.; YOUNG, S. R.; CRAREY, E. T.; WOMACK N. A.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F. MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. retail meats, 2010–2011. **Food Microbiology**. v.62, p.289-297, 2017.

BENINATI, C.; REICH, F.; MUSCOLINO, D.; GIARRATANA, F.; PANEBIANCO, A.; KLEIN, G.; ATANASSOVA, V. Bactérias produtoras de ESBL e MRSA isoladas de produtos de aves e peru importados da Itália. **Checo Journal of Food Sciences**. v.33, n.2, p.97-102, 2015.

BETLEY, M. J.; LÖFDAHL, S.; KREISWIRTH, B. N.; BERGDOLL, M. S.; NOVICK, R. P. Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.81, p.5179-83, 1984.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**. v.170, n.1, p.34-41, 1988.

BLOMSTER-HAUTAMAA, D. A.; KREISWIRTH, B. N.; KORNBLUM, J. S.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. **Journal of Biological Chemistry**. v.261, n.33, p.15783-15786, 1986.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Genetics and Genomics**. v.209, n.1, p.15-20, 1987.

BRASCA, M.; MORANDI, S.; VANONI, L.; COLOMBO, L.; LODI, R. The influence of different cultural conditions on the development and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Scienza Tecnica Lattiero Casearia**. v.56, p.105-115, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.37 de 31 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 8 de novembro de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2017. Disponível em < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 14/07/2017.

BRYAN, F. L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**. v.51, p.663-673, 1988.

BUENO, M.C. Leite de cabra: excelente alimento funcional. **Revista Leite e Derivados**. n.83, p.52, 2005.

BUSINCO, L.; BELLANTI, J. Food allergy in childhood. Hypersensitivity to cow's milk allergens. **Clinical and Experimental Allergy**. v.23, p.481-483, 1993.

CAN, H. Y.; ELMALI, M.; KARAGÖZ, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**. v.37, n.2, p.175-180, 2017.

CAPRILAT. Leit de Cabra no Brasil. Disponível em <<http://www.capritec.com.br/pdf/LeitedeCabranoBrasil.pdf>>. Acesso em: 25/11/2017.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.46, n.4, p.581-586, 2003.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.9, n.1, p.70-6, 2005.

CHA, J.; VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Characterization of the beta-lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**. v.46, p.7822-7831, 2007.

CHESNEY, P. J. Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview. **Journal Infectious Diseases**. v.11, p.51-57, 1989.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-third Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA. 2015.

CLIVER, D. O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. **Marcel Dekker**. 1994, p.613.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Conjuntura Trimestral Caprino-Ovinocultura Pernambuco, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_29_16_55_32_caprinovincultura_-_jun_2016_-_sureg_pe.pdf> . Acesso em: 18/07/2017.

CORDEIRO, P.R.C. Mercado do leite de cabra e de seus derivados. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v.12, n.39, p.32-43, 2006.

CORREIA, R.C.; MOREIRA, J.N.; ARAÚJO, J.L.P. Cadeia produtiva de caprinos ovinos do vale do rio Gavião: elementos para tomada de decisão. Petrolina-PE: **Embrapa Semi-Árido**. p.39, 2001.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and Nucleotide Sequence of the Type E Staphylococcal Enterotoxin Gene. **Journal Of Bacteriology**. v.170, n.7, p.2954-2960, 1988.

DE BUYSER A. L.; JANIN, F.; DILASSERF. Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie and Hygiene I**. v.14, p.677-678, 1985.

DIAS, A. P. M.; PINHEIRO, M. G.; ALVES, F. A. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. **Acta Scientiarum Technology**, v.3, n.1, p.9-20, 2015.

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

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo**. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.65:1576-1582,

EL-AGAMY, E. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**. v.68, p.64-72, 2007.

EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**. v.7, n.4, p.311-316, 1988.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 23/02/2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Production: live animals, livestock primary, livestock processed; **Trade: countries by commodity (imports and exports) 2012**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 08/11/2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Bad bug book. **Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 2012**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UC297627.pdf>> Acesso em: 08/11/2017.

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

GANAI, A. W. ; KOTWAL, S. K.; WANI, N.; MALIK, M. A.; JEELANI, R.; KOUR, S.; ZARGAR, R. Detection of *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.86, n.5, p.508–511, 2016.

GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infectious Diseases**. v.11, n.8, p.595-603, 2011.

GOMES, H. A.; GALLO, C. R. Ocorrência de e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n.15, p.158-161, 1995.

GUIGNARD, B.; ENTENZA, J. M.; MOREILLON, P. β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Pharmacology**. v.5, p.479-489, 2005.

HAENLEIN, G. F. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**. v.51, p.155-163, 2004.

HARRISON, E. M.; COLL, F.; TOLEMAN, M. S.; BLANE, B.; BROWN, N. M.; TÖRÖK, M. E.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Genomic surveillance reveals low prevalence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the East of England. **Scientific Reports**. v.7, n.1, 2017.

HEDE, K. Antibiotic resistance: an infectious arms race. **Nature**. v.509, S2–S3, 2014.

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

HOLMBERG, S. D; BLAKE, P. A. Staphylococcal food poisoning in the United States: new facts and old misconceptions. **Journal of American Medical Association**. v.251, n.4, p.487-489, 1984.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v.43, p.23, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> . Acesso em 05/05/17.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**. v.54, p.384-388, 2015.

JARRAUD, S.; COZON, G.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, M. B; LINA, G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.8, p.2446-2449, 1999.

JAY, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. 3º Ed., Zaragoza: Acribia, 1993. p.804.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7º Ed., New York: Springer, 2005, p.790.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**. v.7, p.997-1004, 2015.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. v.166, n.1, p.20-33, 1986.

JOOB, B.; WIWANITKIT, V. Food poisoning outbreak in Thailand: A review on situations. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v.5, n.1, p.187-189, 2015.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, p.1549-1555, 2000.

KLIMEŠOVÁ, M.; MANGA, I.; NEJESCHLEBOVÁ, L.; HORÁČEK, J.; PONÍŽIL, A.; VONDRUŠKOVÁ, E. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. **Acta Veterinaria Brno**. v.86, n.1, p.3-10, 2017.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. *et al.* (Eds.). **Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology**. Baltimore: **The Williams & Wilkins Co.** 1984, v.2, p.1013-1035.

KOUAMÉ-SINA, S. M.; MAKITA, K.; COSTARD, S.; GRACE, D.; DADIÉ, A.; DJE, M.; BONFOH, B. Hazard identification and exposure assessment for bacterial risk assessment of informally marketed milk in Abidjan, Côte d'Ivoire. **Food and Nutrition Bulletin**. v.33, p.223-234, 2012.

KLUYTMANS, J.A.J.W.; WERTHEIM, H.F.L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**. p.33, p.3-8, 2005.

LARKIN, E.A.; CARMAN, R.J.; KRAKAUER, T.; STILES, B.G. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. **Current Medicinal Chemistry**. v.16, p.4003-4019, 2009.

LEGISLAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO - ALEPE LEGIS. Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007. Dispõe sobre o processo de Produção do Queijo Artesanal e dá outras providências. Disponível em < <http://legis.alepe.pe.gov.br/texto.aspx?id=6392&tipo=TEXTTOORIGINAL>>. Acesso em: 22/02/2018

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

LEIGUE, L.; HILGERT, A. R.; FIORINI, A.; SANTOS, M. F.; VENDRUSCOLO, E. C. G. Occurrence and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* in milk samples of cattle with mastitis, and in the veterinary hospital personnel and dairy workers. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.54, n.2, p.117-128, 2017.

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

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes SEA to SEJ. **Molecular and Cellular Probes**. v.17, n.4, p.139-147, 2003b.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Diseases**. v.189, p.2334-2336, 2004.

LINDSAY, J. A.; RUZIN, A.; ROSS, H. F.; KUREPINA, N.; NOVICK, N. P. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**. v.29, p.527-543, 1998.

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

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **England Journal of Medicine**. v.339, p.520-532, 1998.

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

LYON, B. R.; SKURRAY, R. A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiological Reviews**. v.51, p.88-134, 1987.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**. v.248, p.705-11, 1990.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P. J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**. v.69, p.163-173, 2005.

NAGARAJ, S.; RAMLAL, S.; VENKATASWAMACHARI, B. P.; PAUL, S.; KINGSTON, J.; BATRA, H. V. Differentiation of entC1 from entC2/entC3 with a single primer pair using simple and rapid SYBR Green-based RT-PCR melt curve analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.100, n.19, p.8495-8506, 2016.

NECIDOVÁ, L.; ŠTÁSTKOVÁ, Z.; POS PÍŠILOVÁ, M.; JANŠ TOVÁ, B.; STREJČEK, J.; DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Sciences**. v.27, p.127-133, 2009.

NEVES, M. C.; COSTA, J. R. V.; VIEIRA, V. C.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Resistência aos antimicrobianos e análise da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* por PCR-RAPD. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.77, n.4, p.575-582, 2010.

NJAGE, P. M. K.; DOLCI, S.; JANS, C.; WANGO, J.; LACROIX, C.; MEILE, L. Biodiversity and enterotoxigenic potential of staphylococci isolated from raw and spontaneously fermented camel milk. **British Microbiology Research Journal**. v.3, p.128-138, 2013.

NOGUCHI, N.; TAMURA, M.; NARUI, K.; KAZUNORI, W.; MASANORI, S. Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.25, p. 1129-1132, 2002.

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

OBAIDAT, M. M.; BANI SALMAN, A. E.; ROESS, A. A. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA* *Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1449-7>. 2017.

OLIVER, S.; BOOR, K.; MURPHY, S. C.; MURINDA, S. E. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.6, p.793-806, 2009.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described Staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**. v.246, n. 2, p.191-198, 2005.

ONO, H. K.; SATO'O, Y.; NARITA, K.; NAITO, I.; HIROSE, S.; HISATSUNE, J.; ASANO, K.; HU, D. L.; OMOE, K.; SUGAI, M.; NAKANE, A. Identification and

characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. **Applied and Environmental Microbiology**. v.81, p.7034-7040, 2015.

ORDEN, J. A.; GOYACHE, J.; HERNANDEZ, J.; DOMENECH, A.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. **Journal of Applied Bacteriology**. n.72, p.486-489, 1992.

OTERO, A.; GARCÍA, M. L.; GARCÍA, M. C.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Production of Staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.555-559, 1990.

PALES, A. P.; SANTOS, K. J. G.; FIGUEIRAS, E. A.; MELO, C. S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**. v.1, n.2, p.162-173, 2005.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A. Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.56, n.1, p.71-76, 1996.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISIL, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.145-148, 2009.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL M. S. Enterotoxin H in Staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**. v.59, n.5, p.559-561, 1996.

PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. **Clinical Microbiology and Infection**. v.18, p.626-634, 2012.

POULSEN, L. K. Hints for diagnosis. **Chemical Immunology and Allergy**. v.101, p.59-67, 2015.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' cows' milk and their mixture. **Food Science and Technology**. v.50, p.538-544, 2013.

RAHBAR SAADAT, Y.; IMANI FOOLADI, A. A.; SHAPOURI, R.; HOSSEINI, M. M.; DEILAMI KHIABANI, Z. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v.6, n.5, p.345-349, 2014.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR, A.; CANDEIAS, J. M.; CARDOSO, K. F.; ARAÚJO JR, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strain isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. v.132, p.408-413, 2008.

REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. **Biochemistry**. v.22, p.3907-3912, 1983.

REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification, and some physicochemical properties of Staphylococcal enterotoxin C₃. **Infection and Immunity**. v.45, n.3, p.625-630, 1984.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF, JR. W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**. v.89, p.225-233, 2010.

ROBERN, H.; STAVRIC, S.; DICKIE, N. The application of QAE-Sephadex for the purification of two Staphylococcal enterotoxins. I. Purification of enterotoxin C₂. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.393, n.1, p.148-158, 1975.

SAHYON, N. R. Nutrition education for the healthy elderly population: Isn't time?. **Journal of Nutrition Education and Behavior**. v.34, p.42-47, 2002.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.77, n.3, p. 545-555, 2010.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.70, n.3, p.302-310, 2011.

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

SCHLIEVERT, P. M.; JABLONSKI, L.M.; ROGGIANI, M.; SADLER, I.; CALLANTINE, S.; MITCHELL, D. T.; OHLENDORF, D. H.; BOHACH, G. A. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infection and Immunity**. v.68, n.6, p.3630-3634, 2000.

SECRETÁRIA DE SAÚDE DE PERNAMBUCO - SES. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/programa/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/vigilancia-epidemiologica-das-doencas-0>>. Acesso em: 18/12/2017.

SHAFER, W. M.; IANDOLO, J. J. Staphylococcal Enterotoxin A: a Chromosomal Gene Product. **Applied and Environmental Microbiology**. v.36, n.2 p.389-391, 1978.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. v.129, p.317-25, 1977.

SHORE, A.C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL B.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; COLEMAN, D. C. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.55, n.8 p.3765–3773, 2011.

SILVA, L. C. A.; PESSOA, D. A. N.; SILVA, L. S. A. Aquino SS, Macêdo MMS, Mattos RAT, et al. Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.82, p.1-4, 2015.

SLAČANAC, V.; BOŽANIĆ, R.; HARDI, J.; SZABÓ, J. R.; LUČAN, M.; KRSTANOVIĆ, V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. **International Journal of Dairy Technolog**. v.63, n.2, p.171-189, 2010.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.60-67, 2002.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p.53-57, 2012.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.1, p.41-45, 2006.

STASTKOVA, Z.; KARPISKOVA, S.; KARPISKOVA, R. Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. **Veterinarni Medicina**. v.54, n.9, p.419-426, 2009.

STEWART, G. C. *Staphylococcus aureus*. In Foodborne pathogens: **Microbiology and Molecular Biology**; Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., Smith, J.L., Eds.; Caister Academic Press: Norfolk, 2005, p.273-284.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Non-human antibiotic use and resistance. **Drug Resistance Updates**. v.3, p.2007-2009, 2001.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**. v.64, p.664-668, 2001.

TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, JR. V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**. v.28, p.603-661, 2015.

TODD, J.; FISHAUT, M.; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. **Lancet**. v.2, p.1116-1118, 1978.

TOMASI, L. C.; SPAZZIANI, M. L. Construindo atitudes para uma vida saudável: uma experiência educativa com alunos do ensino fundamental. **Revista Simbio-Logias**. v.1, n.2, p.1-15, 2008.

TREMAINE, M. T.; BROCKMAN, D. K.; BETLEY, M. J. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). **Infection and Immunity**. v.61, p.356-359, 1993.

TUTSUURA, S.; MURATA, M. Temperature dependence of Staphylococcal enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v.77, p.30-37, 2013.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**. v.47, p.381-7, 2005.

WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In *Principles and practice of infectious diseases*. G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, editors. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania, USA. p.2069-2092, 2000.

WANG, X.; MENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, T.; ZHANG, Y.; YANG, B.; XI, M.; XIA, X. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p.142-147, 2012.

WIENEKEA, A.; GILBERTR, J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v.4, p.135-143, 1987.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiology and Infection**. v.110, p.519-531, 1993.

WILSON, G. J.; SEO, K. S.; CARTWRIGHT, R. A.; CONNELLEY, T.; CHUANG-SMITH, O. N.; MERRIMAN, J. A.; GUINANE, C. M.; PARK, J. Y.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; MORRISON, W. I.; FITZGERALD, J. R. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. **Plos Pathogens**. v.7, n.10, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Foodborne diseases. 2017. Disponível em <http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/>. Acesso em: 17/10/2017.

XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; WANG, X.; GE, W.; WU, C. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**. v.59, p.644-650, 2016.

ZHANG, H. Z.; HACKBARTH, C. J.; CHANSKY, K. M.; CHAMBERS, H. F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. **Science**. v.291, p.1962-1965, 2001.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**. v.345, p.15-18, 2000.

ZWEIFEL, C.; RUSCH, M.; CORTI, S.; STEPHAN, R. Determination of various microbiological parameters in raw milk and raw milk cheese produced by biofarms. **Archiv für Lebensmittel Hygiene**. v.57, p.13-16, 2006.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra produzido no estado de Pernambuco

Resumo

A fabricação de queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra é composta pelas etapas de obtenção do leite, refrigeração, manipulação e armazenamento que aumentam o risco de contaminação do produto. Objetivou-se neste estudo avaliar o nível de contaminação por *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo coalho artesanal produzido com leite de cabra cru no estado de Pernambuco, além de avaliar a concordância entre a técnica oficial da Instrução Normativa nº62/2003 (MAPA) e a técnica molecular (gene *nuc*) para identificar *S. aureus* no queijo. Houve crescimento de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em 100% das amostras e a contagem variou de $7,0 \times 10^3$ a $8,6 \times 10^6$ UFC/g. Das 30 amostras analisadas, 18 (60,0%) apresentaram valores superior ou igual a 10^5 UFC/g e 21 (70,0%) estavam contaminadas por *S. aureus*. A concordância entre os métodos de diagnóstico de *S. aureus* em queijo coalho caprino foi moderada. O elevado nível de contaminação dos queijos revela a necessidade de ações de melhoria das condições de elaboração do produto com finalidade de garantir um produto seguro aos consumidores.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, intoxicação alimentar, queijo caprino, legislação.

Abstract

The manufacture of artisanal curd cheese made from goat's milk is composed of the steps of obtaining milk, refrigeration, handling and storage that increase the risk of contamination of the product. The objective of this study was to evaluate the level of contamination by *Staphylococcus aureus* in samples of artisanal curd cheese produced with raw goat's milk in the state of Pernambuco, in addition to evaluating the agreement between the official technique of Normative Instruction nº62/2003 (MAPA) and the molecular technique (*nuc* gene) to identify *S. aureus* in cheese. There was growth of typical *Staphylococcus aureus* colonies in 100% of the samples and the count ranged from $7,0 \times 10^3$ to $8,6 \times 10^6$ CFU/g. Of the 30 analyzed samples, 18 (60.0%) presented values greater than or equal to 10^5 CFU/g and 21 (70.0%) were

contaminated by *S. aureus*. The agreement between the diagnostic methods of *S. aureus* in goat cheese was moderate. The high level of contamination of cheeses reveals the need for actions to improve the preparation conditions of the product in order to guarantee a safe product to consumers.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, food intoxication, goat cheese, legislation.

Introdução

A caprinocultura leiteira apresentou expressivo crescimento no Brasil, com destaque para a região Nordeste, em virtude de suas condições climáticas favoráveis para atividade, associadas à tradição de produção leiteira caprina nas diversas mesorregiões. O efetivo nacional de caprinos em 2015 foi de 9,61 milhões de cabeças com 92,7% deste efetivo na região Nordeste. A Bahia é o maior produtor com 27,4% e Pernambuco ocupa o segundo lugar com 25,3% do total do efetivo nacional de caprinos (IBGE, 2015).

No panorama mundial da produção de leite caprino, em 2011 foram produzidos 15,9 milhões de toneladas; em relação à produtividade de queijo elaborado com leite caprino foram produzidas aproximadamente 368,6 mil toneladas (FAO, 2012). A Índia foi o maior produtor de leite caprino em 2011 com 4.594.000 toneladas, enquanto que a França foi o 5º maior produtor de leite com 657.146 toneladas e o primeiro produtor de queijo com 91.000 toneladas (FAO, 2012). Dentre os países da América Latina, o Brasil foi considerado um dos maiores produtores de leite caprino com produção de 148.149 toneladas e não há registros em relação à produção de queijos (FAO, 2012).

Apesar de ter ocorrido um impulso na produção de leite de cabra na região Nordeste, ainda existem desafios correntes na produção de leite e seus derivados (GOTTARDI *et al.*, 2008), uma vez que esta produção possui base familiar sem tecnificação e cuidados higiênico-sanitários (CORREIA *et al.*, 2001). Este fato representa risco ao consumo, uma vez que o leite de cabra e seus derivados podem veicular microrganismos patogênicos (NECIDOVÁ *et al.*, 2009; XING *et al.*, 2016).

O risco de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é maior quando se trata de leite de cabra cru, pois na elaboração de queijos artesanais a

materia prima não é submetida a tratamento térmico prévio, aumentando o risco de veiculação de microrganismos patogênicos (RALL *et al.*, 2008). Dentre os agentes bacterianos destaca-se *Staphylococcus aureus*, devido ao seu potencial de produção de enterotoxinas estafilocócicas, que podem causar surtos de intoxicação alimentar (JOHLER *et al.*, 2015), além da capacidade de formação de biofilme (AKBAS *et al.*, 2015) e resistência a antimicrobianos (JAMALI *et al.*, 2015).

A contaminação de leite de cabra e seus derivados por *S. aureus* tem sido cada vez mais relatada, estudos realizados por Lyra *et al.* (2013) e Ferreira *et al.* (2014) detectaram a presença desse patógeno em leite de cabra no Brasil. Nesse aspecto, a qualidade do leite influenciará na qualidade final do queijo coalho que normalmente é consumido cru, assado, frito com ou sem acompanhamento, sendo considerado um dos derivados lácteos de maior consumo na região Nordeste do Brasil. (DUARTE *et al.*, 2005).

Apesar da importância da caprinocultura na região Nordeste do Brasil, não foi encontrado na literatura consultada, estudos que avaliaram o nível de contaminação por *S. aureus* em coalho artesanais elaborados com leite de cabra cru no Estado de Pernambuco.

Objetivou-se neste estudo avaliar o nível de contaminação por *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo coalho artesanal produzido com leite de cabra cru no estado de Pernambuco, além de avaliar a concordância entre as técnicas oficiais da Instrução Normativa nº62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a técnica molecular (gene *nuc*) para identificar *S. aureus* no queijo.

Material e Métodos

A amostragem utilizada neste estudo foi do tipo não probabilística por conveniência (SAMPAIO, 1998). Foram coletadas 30 amostras de queijos do tipo coalho artesanal produzido com leite de cabra cru, sendo uma amostra por estabelecimento em 11 municípios pernambucanos localizados na região do Sertão.

As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais de produtos de origem animal, sendo realizada uma coleta por estabelecimento sem ocorrer repetições de coleta no mesmo estabelecimento (Tab. 1).

Tabela 1. Número de amostras coletadas em estabelecimentos comerciais e seus respectivos municípios amostrados.

| Municípios | Nº de Esbelecimento Comerciais |
|-------------------|---------------------------------------|
| Município A | 1 |
| Município B | 5 |
| Município C | 2 |
| Município D | 1 |
| Município E | 2 |
| Município F | 1 |
| Município G | 3 |
| Município H | 1 |
| Município I | 9 |
| Município J | 3 |
| Município K | 2 |
| Total | 30 |

O número de estabelecimentos de coleta por município foi definido a partir da observação realizada *in loco* de acordo com os estabelecimentos que comercializavam o queijo coalho elaborado com leite de cabra cru. Cada amostra pesava aproximadamente 500g e após adquiridas foram armazenadas em sacos tipo *zip* (Talge Brasil LTDA., Tailândia) esterilizados e identificados, sendo acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas para a realização das análises microbiológicas.

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* seguiu-se a metodologia recomendada pela Instrução Normativa de nº62/2003 do MAPA (BRASIL, 2003). Após o crescimento bacteriano foi realizada a contagem das placas que continham entre 20 a 200 colônias com os resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC/g).

Foram caracterizadas como típicas, as colônias que apresentaram cor negra brilhante com halo opaco na periferia da colônia (ocorre devido à precipitação de ácidos graxos) e outro halo claro transparente no ágar *Baird-Parker* (resultante da hidrólise da lipovitelina). As colônias atípicas foram aquelas de cor acinzentada ou negra brilhante sem a presença dos halos ou com apenas um dos halos (BRASIL, 2003).

Para a seleção das colônias seguiu-se a metodologia da IN nº62/2003 e no total foram selecionadas 158 colônias típicas de *S. aureus*. Não foram selecionadas colônias nas placas que continham apenas colônias atípicas, e nestas foi realizada apenas a contagem de UFC/g. Nas placas que continham os dois tipos de colônias foram selecionadas três colônias típicas e duas atípicas ou apenas colônias típicas (cinco colônias típicas) (BRASIL, 2003).

Após a seleção das colônias foi realizada a coloração de Gram de acordo com Stingham *et al.* (2002) para caracterização morfotintorial de *Staphylococcus* spp. As colônias típicas foram inoculadas isoladamente em tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e mantidas a 37°C durante 24h para a realização da prova da coagulase.

A suspensão bacteriana em caldo BHI foi aliqüotada (300µL) em tubo estéril, contendo o mesmo volume de plasma de coelho reconstituído (*Laborclin*, Vargem Grande dos Pinhais, Brasil). Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C e após esse tempo foi verificada a presença ou ausência de coágulo no interior do tubo (BRASIL, 2003).

Todas as colônias típicas de *S. aureus* em ágar *Baird-Parker* (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), positivas ou negativas na prova de coagulase foram semeadas novamente em ágar *Baird-Parker* para obtenção de uma maior quantidade de bactérias para a extração do DNA genômico, seguindo a metodologia de Fan *et al.* (1995). O DNA obtido foi analisado quanto ao grau de pureza e concentração em espectrofotômetro com realização das leituras em absorbância de 260nm.

Para a confirmação molecular da espécie *S. aureus* foi realizada a amplificação da região específica do gene *nuc* de acordo com a técnica descrita por Kateete *et al.* (2010). Como controle positivo para detecção do gene *nuc* foi utilizada a cepa ATCC® 43300 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Como controle negativo utilizou-se DNA-Free Water (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Os resultados dos testes da PCR e coagulase foram expressos em frequências absolutas e relativas. Já os resultados da contagem de UFC/g foram expressos em valores absolutos, média e desvio padrão. Para a avaliação dos resultados da PCR e coagulase realizou-se uma análise

univariada, utilizando os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher e o teste *kappa* para avaliar a concordância entre os dois métodos de diagnóstico (FIELD, 2009). O programa Epi Info (TM) 3.5.2 (Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta-USA) foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Resultados

Na análise microbiológica do queijo coalho elaborado com leite de cabra observou-se o crescimento de colônias características de *S. aureus* em ágar *Baird-Parker* em 100,0% das amostras analisadas.

Quanto à variação na contagem de UFC/g de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus aureus*, os menores valores ($7,0 \times 10^3$) foram observados no município B e os maiores ($8,6 \times 10^6$) no município H. Das amostras analisadas, 60,0% (18/30) amostras tiveram valores igual ou superior a 10^5 UFC/g no ágar *Baird-Parker* (Tab. 2).

Tabela 2. Contagens de UFC/g em ágar *Baird-Parker* de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus aureus* nos diferentes municípios e estabelecimentos do Estado de Pernambuco.

| Município | Estabelecimento | UFC/g |
|-------------|-----------------|--------------------|
| Município A | 1 | $3,3 \times 10^4$ |
| Município B | 2 | $7,3 \times 10^5$ |
| | 3 | $3,3 \times 10^4$ |
| | 4 | $4,0 \times 10^4$ |
| | 5 | $8,6 \times 10^5$ |
| | 6 | $7,0 \times 10^3$ |
| | Município C | 7 |
| 8 | | $8,0 \times 10^3$ |
| Município D | 9 | $1,06 \times 10^5$ |
| Município E | 10 | $2,7 \times 10^5$ |
| Município F | 11 | $9,5 \times 10^4$ |
| Município F | 12 | $1,1 \times 10^5$ |
| Município G | 13 | $1,48 \times 10^6$ |
| | 14 | $2,6 \times 10^6$ |
| | 15 | $7,0 \times 10^4$ |
| Município H | 16 | $8,6 \times 10^6$ |

| | | |
|--------------------|----|--------------------|
| | 17 | $4,8 \times 10^4$ |
| | 18 | $2,7 \times 10^6$ |
| | 19 | $1,59 \times 10^5$ |
| | 20 | $2,4 \times 10^4$ |
| Município I | 21 | $3,0 \times 10^5$ |
| | 22 | $6,7 \times 10^5$ |
| | 23 | $2,6 \times 10^6$ |
| | 24 | $2,0 \times 10^4$ |
| | 25 | $1,39 \times 10^5$ |
| | 26 | $3,2 \times 10^5$ |
| Município J | 27 | $2,05 \times 10^4$ |
| | 28 | $1,63 \times 10^5$ |
| Município K | 29 | $9,1 \times 10^5$ |
| | 30 | $3,4 \times 10^5$ |

Além da contagem de UFC/g foram selecionadas 158 colônias típicas sugestivas de *S. aureus*, das quais 34,1% (54/158) foram positivas na identificação de *S. aureus* pela detecção do gene *nuc* na PCR. Já em relação à contaminação dos queijos coalho por municípios, 81,8% (9/11) dos queijos coalho caprino estavam contaminados por *S. aureus* e 70,0% (21/30) dos estabelecimentos tiveram amostras de queijos contaminados com *S. aureus* (Tab. 3).

Tabela 3. Frequência de estabelecimentos com queijo coalho caprino contaminados por *S. aureus* (confirmação: gene *nuc*) comercializados no Estado de Pernambuco. Frequência Absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.).

| Municípios | nº de estabelecimentos | Gene <i>nuc</i> | |
|--------------------|------------------------|-----------------|----------|
| | | F.A. | F.R. (%) |
| Município A | 1 | 0 | 0,0 |
| Município B | 5 | 2 | 40,0 |
| Município C | 2 | 0 | 0,0 |
| Município D | 1 | 1 | 100,0 |
| Município E | 2 | 1 | 50,0 |
| Município F | 1 | 1 | 100,0 |
| Município G | 3 | 3 | 100,0 |
| Município H | 1 | 1 | 100,0 |
| Município I | 9 | 7 | 77,78 |
| Município J | 3 | 3 | 100,0 |
| Município K | 2 | 2 | 100,0 |
| Total | 30 | 21 | |

Quanto à distribuição por região, 19,0% (4/21) das amostras contaminadas foram da mesorregião do Sertão Pernambucano e os outros 81,0% (17/21) eram do Agreste Pernambucano.

Observou-se moderada concordância entre os resultados obtidos na prova de coagulase e na técnica de PCR para o gene *nuc* na identificação de *Staphylococcus aureus* (Tab. 4).

Tabela 4. Resultado da análise de concordância entre os testes de PCR e coagulase das colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo coalho caprino, Pernambuco, 2017.

| Coagulase | PCR | | Total | Valor P | K |
|-----------|------------|------------|-------------|---------|-------|
| | Positiva | Negativa | | | |
| Positiva | 53,9% (48) | 46,1% (41) | 100,0% (89) | <0,001* | 0,428 |
| Negativa | 8,7% (6) | 91,3% (63) | 100,0% (69) | | |

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase; * Associação significativa ao nível de 5,0% no teste do Exato de Fisher; *k* – teste *Kappa*. Valores para interpretação de Teste *KAPPA*: Pobre (<0,20); fraca (0,21 - 0,40); moderada (0,41 - 0,60); boa (0,61 - 0,80) e excelente (>0,80) (LANDIS E KOCH, 1977).

Discussão

Os resultados obtidos no estudo demonstraram que todas as amostras analisadas se encontram fora dos padrões exigidos na Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 que preconiza 5×10^2 UFC/g para queijos de muita alta umidade, como é o caso do queijo tipo coalho elaborado com leite de cabra. Os níveis mais altos de contaminação (UFC/g) foram referentes às amostras coletadas nos municípios G, H e I (Tab. 2). Considerando os valores estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2001), no que se refere à contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP), pode-se afirmar que todas as amostras obtidas nos estabelecimentos comerciais no estado de Pernambuco desse estudo são impróprias para o consumo humano.

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas são preocupantes para a saúde dos consumidores deste tipo de queijo quando se associa o número de UFC/g e a possibilidade de contaminação por *S. aureus*. Quanto maior a contaminação por *Staphylococcus* spp., maior a possibilidade da

presença de *S. aureus*. 60,0% (18/30) das amostras de queijo deste estudo tiveram valores igual ou superior a 10^5 UFC/g (Tab. 2), valor este que é considerado de risco para a intoxicação dos consumidores (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Isto foi constatado por Johler *et al.* (2015) em um surto de intoxicação alimentar provocado por enterotoxinas estafilocócicas em queijo elaborado com leite de cabra na Suíça onde foram detectados valores de $6,7 \times 10^6$ UFC/g de *Staphylococcus* spp. O grau de contaminação nas amostras eleva o risco de intoxicação alimentar se os isolados de *S. aureus* possuírem genes codificadores de enterotoxinas e os expressarem na amostra (SEO e BOHACH, 2007), além do risco de causar surtos de intoxicação alimentar (WIENEKE e GILBERT 1987; JOHLER *et al.*, 2015).

Dos onze municípios estudados, 81,8% (9/11) tiveram pelo menos uma amostra contaminada por *S. aureus* (Tab. 3). Sugere-se que a não detecção de *S. aureus* nas amostras de queijo coalho nos municípios A e C deva estar associada a melhores condições higiênicos-sanitários em relação aos demais municípios no que concerne a obtenção do leite de cabra, a elaboração e manipulação do queijo, bem como a temperatura de conservação abaixo de 10°C durante o transporte e na comercialização. Picoli *et al.* (2006) relataram que a contaminação por *S. aureus* de queijos elaborados com leite caprino tem como principais responsáveis os manipuladores portadores de *S. aureus*, além de sanitizações inadequadas nos equipamentos e utensílios utilizados na elaboração do queijo caprino que os contaminam. Ainda, a contaminação do queijo coalho pode ocorrer devido à veiculação de *S. aureus* através do leite de cabra com mastite (MOTA, 2008).

A contaminação do queijo coalho caprino é preocupante, uma vez que a ocorrência de *S. aureus* foi de 34,1% (54/158) (Tab. 4). Este resultado está acima da frequência relatadas em estudos realizados com leite caprino no Brasil, como descrito por Lyra *et al.* (2013) que em 74 amostras de *Staphylococcus* spp. isolados em leite de cabra, apenas 9,46% (7/74) foram *S. aureus* e Ferreira *et al.* (2014) que em estudo semelhante analisaram 2.024 amostras de leite de cabra, obtendo uma frequência de 2,71% (55/2.024) de *S. aureus*.

A contaminação ou não das amostras por *S. aureus* em leite ou derivados pode estar associada à epidemiologia do agente infeccioso nos

rebanhos de caprinos leiteiros (MOTA, 2008), a presença de manipuladores com lesões cutâneas e/ou portadores assintomáticos do agente, já que normalmente a contaminação de alimentos por *S. aureus* ocorre durante a manipulação direta dos alimentos, higienização dos utensílios e local de armazenamento dos queijos nos estabelecimentos (FERREIRA *et al.*, 2010).

Dos 30 estabelecimentos analisados, 70,0% (21/30) tiveram amostras contaminadas com *S. aureus* e apenas 19,0% (4/21) foram oriundos da mesorregião do Sertão Pernambucano (Tab. 3). Um fato observado nos estabelecimentos da mesorregião do Agreste e que pode ter favorecido a contaminação foi o armazenamento inadequado dos queijos em refrigeradores marcando temperaturas acima de 10°C. Além disso, alguns desses queijos são produzidos no Sertão e muitas vezes são transportados de forma inadequada em caixas isotérmicas sem refrigeração para os estabelecimentos comerciais na região Agreste para comercialização.

Nos estabelecimentos do Sertão não foram observadas irregularidades no armazenamento dos queijos, que é uma importante causa de contaminação dos alimentos. Foi observado em ambas as regiões o uso dos mesmos utensílios para manipulação dos alimentos comercializados (produtos lácteos e cárneos) o que pode contribuir para a contaminação cruzada entre os alimentos (MÜRMAN *et al.*, 2008).

É difícil a identificação e confirmação de *S. aureus* nos queijos analisados seguindo apenas a metodologia proposta pela IN nº62/2003 (BRASIL, 2003). Apesar de a Legislação brasileira propor uma metodologia para enumeração de SCP no ágar *Baird-Parker* e identificação de *S. aureus* por meio da prova complementar de coagulase, esta pode ser falha na identificação de *S. aureus*, pois já se sabe que outras espécies de *Staphylococcus* como *S. aureus* spp. *anaerobius*; *S. intermedius*; *S. hyicus* e *S. delphini* também são coagulase positivo (KLOSS, 1990). Desta forma, para confirmar a presença de *S. aureus* nas amostras também foi realizada uma análise de concordância entre os resultados obtidos na prova da coagulase e na técnica de PCR do gene *nuc* que é referência mundial na identificação de *S. aureus* (BRAKSTAD *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos nestes testes de diagnóstico demonstram uma moderada concordância entre o teste da coagulase e a PCR, confirmando que

a técnica molecular foi mais sensível para esta identificação (Tab. 4). Isto deve ter ocorrido devido à possibilidade de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo estarem sendo identificadas como *S. aureus* no teste da coagulase (KLOSS, 1990). Assim é necessário revisar a Legislação quanto à confirmação de *S. aureus* somente por meio de prova fenotípica.

Conclusão

O elevado grau de contaminação das amostras de queijo coalho caprino por *Staphylococcus aureus* indica falhas na cadeia de obtenção do leite e elaboração dos queijos. Além disso, existe a necessidade de ações para a melhoria nas condições de elaboração do produto, com a finalidade de garantir o cumprimento das exigências higiênico-sanitárias previstas para os estabelecimentos que comercializam este tipo de queijo nesta região.

Referência

AKBAS, M. Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. **International Journal of Food Science & Technology**. v.50, p.1666-1672, 2015.

BRAKSTAD, O.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**. n.30, p.1654-1660, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2001. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b> Acessado em: 05/12/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de**

origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 15/12/17.

EUROPEAN COMMISSION. Nº 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs Official Journal of the European Union, L 338/1, 2005.

CORREIA, R.C.; MOREIRA, J.N.; ARAÚJO, J.L.P. Cadeia produtiva de caprinos ovinos do vale do rio Gavião: elementos para tomada de decisão. Petrolina-PE: **Embrapa Semi-Árido**. p.39, 2001.

FAN H .H.; KLEVEN S. H.; JACKWOOD M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary *primers* to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**. v. 39, p.729-735, 1995.

FERREIRA, G.B.; OLIVEIRA, A.C.S.; MARSON, J.M.; TERRA, A.P.S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “Minas frescal” comercializados na região do triângulo mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v.34, n.3, p.575-589, 2010.

FERREIRA, D.H.; CARVALHO, M.G.X., NARDELLI, M.J. ; SOUSA, F.G.C.; OLIVEIRA, C.J.B. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.7, p.633-636, 2014.

FIELD, A. Descobrimo a estatística usando o SPSS. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Production: live animals, livestock primary, livestock processed; **Trade: countries by commodity (imports and exports) 2012**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 25/05/2017.

GOTTARDI, C. P. T.; MURICY, R. F.; CARDOSO, M.; SCHIMDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Ciência Rural**, v. 38, n.3, p.743-748, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v.43, p.23, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> . Acesso em 05/05/17.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**. v.54, p.384-388, 2015.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**. v.7, p.997-1004, 2015.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A. OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.9, p.23-29, 2010.

KLOSS, W.E. Systematics and natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**. v.69, n.19, p.25S-37S, 1990.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v.33, p.159-174, 1977.

LYRA, D.G.; SOUSA, F.G.C.; BORGES, M.F.; GIVISIEZ, P.E.N.; QUEIROGA, R.C.R.E.; SOUZA, E.L.; GEBREYES, W.A.; OLIVEIRA, C.J.B. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from bulk goat milk. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.10, n.2, p.126-130, 2013.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**. v.2, n.3, p.57-61, 2008.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M.C.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, p.529-534, 2008.

NECIDOVÁ, L.; ŠŤÁSTKOVÁ, Z.; POS PÍŠILOVÁ, M.; JANŠ TOVÁ, B.; STREJČEK, J.; DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Sciences**. v.27, p.127-133, 2009.

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

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR, A.; CANDEIAS, J. M.; CARDOSO, K. F.; ARAÚJO JR, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strain isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. v.132, p.408-413, 2008.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1998, 221p.

SEO, K. S.; BOHACH, G. A. In: *Staphylococcus aureus*. Doyle M, Montville T, editors. Washington, D.C: ASM Press; 2007. p.493-518. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers.

STINGHEN, A.E.M.; ALBINI C.A.; SOUZA, H.A.P.H.M. Coloração de Gram: Como fazer, Interpretar e Padronizar. Curitiba: **Microscience**, 2002, 70p.

WIENEKEA, A.; GILBERTR, J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v.4, p.135-143, 1987.

XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; WANG, X.; GE, W.; WU, C. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**. v.59, p.644-650, 2016.

5.2. Artigo 2

Alta frequência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos β -lactâmicos em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra produzido na região nordeste do Brasil

Resumo: A ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes a β -lactâmicos em queijos artesanais caprino tem sido cada vez mais relatada, sendo tratada como relevante na saúde pública. Objetivou-se neste estudo relatar a frequência de *S. aureus* portadoras de genes de resistência *blaZ* e *mecA* e de genes codificadores de EEs do tipo SEA, SEB, SEC, SED, SEE e TSST-1 em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra produzidos na região nordeste do Brasil. Foram analisados 54 isolados de *S. aureus* caracterizados por meio de provas bioquímicas e molecular. Observou-se 42,6% (23/54) foram positivos na PCR para o gene *blaZ* e 7,4% (4/54) demonstraram resistência à meticilinana no teste fenotípico. Genes que codificam as Enterotoxinas e *mecA* não foram detectados. A elevada frequência de *S. aureus* portadores do gene *blaZ* e a identificação de cepas resistente à meticilina é um uma preocupação para a saúde dos consumidores deste tipo de queijo.

Palavras-chave: Resistência, antimicrobianos, *blaZ*.

Introdução

A caprinocultura é reconhecida como uma das atividades mais importantes para a Região Nordeste. O estado de Pernambuco é considerado o segundo maior produtor de caprinos no Brasil (IBGE, 2015). Apesar da importância econômica da caprinocultura, o sistema de produção possui baixa tecnificação e manejo inadequado, predispondo o rebanho às enfermidades que acarretam prejuízos econômicos (CORDEIRO, 2006). Além do impacto econômico, ainda existe o risco para saúde dos consumidores de alimentos de origem caprina, uma vez que microrganismos patogênicos podem ser veiculados pelo leite caprino e seus derivados, destacando-se *Staphylococcus aureus* (XING et al., 2016). Esta bactéria pode contaminar o leite por meio da secreção direta do úbere (MØRK et al., 2010), ou durante uma das etapas de obtenção e/ou processamento do leite cru (ARGUDIN et al., 2010).

S. aureus é considerado um dos principais microrganismos patogênicos causadores de intoxicação alimentar e infecções em humanos e animais (WANG et al., 2012). É um agente infeccioso de importância mundial para saúde pública (RAHBAR SAADAT et al., 2014), pelo potencial zoonótico devido

ao risco de produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE), contaminando os alimentos e podendo causar gastroenterites alimentares (XING et al., 2016), como também produção de biofilme, que eleva o risco de transmissão e contaminação de alimentos (AKBAS et al., 2015) e resistência a antimicrobianos (JAMALI et al., 2015).

Estudos anteriores já relataram a importância da veiculação de *S. aureus* em queijos elaborados com leite de cabra e o potencial das EE em causar intoxicação alimentar em humanos (DE BUYSER et al., 1985; WIENEKE e GILBERT, 1987; JOHLER et al., 2015). Além do risco de intoxicação alimentar, também existe uma grande preocupação mundial com as cepas de *S. aureus* portadoras de genes de resistência como exemplo o gene *blaZ* que confere resistência aos β -lactâmicos não estáveis (ZHANG et al., 2001) e o gene *mecA* que atribui resistência a alguns grupos de β -lactâmicos, tais como o das cefalosporinas (cefotaxima e ceftriaxona) e das penicilinas estáveis (oxacilina e metilicina) (RUDKIN et al., 2012).

Apesar da importância de veiculação *S. aureus* em queijos artesanais elaborados com leite de cabra e seu impacto à Saúde Pública, informações sobre o tema são escassas na literatura nacional. Objetivou-se neste estudo determinar a ocorrência de cepas de *S. aureus* portadoras de genes de resistência *blaZ* e *mecA* e de genes codificadores de EEs do tipo SEA, SEB, SEC, SED, SEE e TSST-1 em queijos artesanais elaborados com leite de cabra comercializados no estado de Pernambuco, Brasil.

Material e Métodos

Amostras de queijo coalho caprino

No período compreendido entre março a agosto de 2017 foram coletadas 30 amostras de queijos coalho artesanais elaborados com leite de cabra, sendo uma amostra por estabelecimento comercial em 11 municípios do estado de Pernambuco localizados nas regiões do Sertão (municípios A, B, C, D, E) e Agreste (municípios F, G, H, I, J e K). As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais de produtos de origem animal, sendo realizada uma coleta em estabelecimento no município A; cinco amostras no município B; duas no município C; uma no município D; duas no município E; uma no

município F; três no município G; uma no município H; nove no município I; três no município J e duas no município K (Figura 1).



Figura 1. Distribuição de amostras por municípios amostrados no estado de Pernambuco.

Cada amostra pesou aproximadamente 500g e depois de adquiridas foram armazenadas em sacos tipo *ziplock*® esterilizados e identificados, sendo acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável em temperatura de (4 a 8°C) e transportadas ao laboratório para as análises microbiológicas e moleculares.

Isolamento de *Staphylococcus aureus*

O isolamento de *Staphylococcus aureus* foi realizado conforme a metodologia recomendada pela Legislação brasileira (BRASIL, 2003), sendo pesados 25 gramas de diferentes partes de cada amostra de queijo. As frações foram transferidas para sacos tipo *ziplock*® estéreis, contendo 225mL de solução salina estéril a 0,85%. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos em *Stomacher*® e a partir desta solução foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} .

A partir das diluições realizadas foram retiradas alíquotas de 0,1mL e inoculadas em duplicata com o auxílio da alça de *Drigalski* em ágar Baird-Parker (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (*Himedia*, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas a 35-37°C por 48 horas (BRASIL, 2003). As colônias no ágar Baird-Parker foram classificadas em típicas e atípicas. Foram selecionadas um total de 158 colônias típicas de *S. aureus*.

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Após a seleção das 158 colônias sugestivas de *S. aureus* realizou-se a prova de coagulase e as colônias de *Staphylococcus* coagulase positivo foram submetidas à extração do DNA para a confirmação molecular de *S. aureus*. Para a extração do material genético seguiu-se a metodologia proposta por Fan et al. (1995). Em seguida o DNA obtido foi quantificado e analisado quanto ao grau de pureza em um espectrofotômetro com realização das leituras em absorvância de 260nm.

Para a confirmação molecular da espécie *S. aureus* foi realizada a amplificação da região específica do gene *nuc* de acordo com a técnica descrita por Kateete et al. (2010), com adaptações nas concentrações dos reagentes. Para isto, as reações foram adaptadas para o volume final de 25µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (20pmol cada) conforme tabela 1, tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs e 1U *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). Foi utilizado o seguinte perfil térmico das reações: etapa inicial de 5 min. a 94°C, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 65°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min. A última etapa consistiu de extensão final a 72°C por 5 min. Em seguida, 20µL da reação foram submetidos à eletroforese por 40 minutos a 100V em gel de agarose a 1,5% corados com *BlueGreen*, visualizados e fotografados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Como controle positivo para detecção do gene *nuc* foi utilizada a cepa ATCC[®] 43300 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Como controle negativo utilizou-se DNA-Free Water (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Pesquisa do gene *blaZ*

Para a detecção do gene *blaZ* foi realizada a técnica de PCR convencional utilizando a metodologia descrita por Sawant et al. (2009), com adaptações nas concentrações dos reagentes. Para isto, as reações foram formatadas para um volume final de 15 µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (20pmol cada) conforme tabela 1, tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs e 1U de *Taq*. DNAPolymerase

(Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações envolveu um passo inicial de 4 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 50,5°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. A última etapa consistiu de extensão final a 72°C por 5 min. Em seguida, 10µL da reação foram submetidos à eletroforese por 40 minutos a 100V em gel de agarose a 1,5% corados com *BlueGreen*, visualizados e fotografados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Como controle positivo para detecção do gene *blaZ* foi utilizada a cepa ATCC® 29213 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Como controle negativo utilizou-se DNA-Free Water (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Pesquisa do gene *mecA*

Para detecção do gene *mecA* foi realizada a técnica de PCR convencional, seguindo a metodologia descrita por Paterson et al. (2012) e Nakagawa et al. (2005), com adaptações nas concentrações dos reagentes. Para isto, as reações serão montadas em um volume final de 20 µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (10pmol cada) conforme tabela 1, tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs e 1U *Taq*. DNA polymerase (Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações consistiu um passo inicial de 1min. a 94°C, seguido de 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 68°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. Em seguida, 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. A última etapa consistirá de extensão final a 72°C por 2 min. Posteriormente, 15µL da reação serão submetidos à eletroforese por 40 minutos a 100V em gel de agarose a 2,0% corados com *BlueGreen*, visualizados e fotografados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Como controle positivo para detecção do gene *mecA* foi utilizada a cepa ATCC® 43300 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Como controle negativo utilizou-se DNA-Free Water (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst*

Para detectar os genes codificadores de enterotoxinas *sea*, *seb* e *sed* foi realizada a técnica de PCR convencional utilizando a metodologia descrita por

Becker et al. (1998). Para os genes *sec*, *see* e *tst* foram realizadas a técnica de PCR convencional utilizando a metodologia descrita por Mehrotra et al. (2000). Nas duas metodologias houve adaptações das concentrações dos reagentes. Para isto, as reações foram padronizadas para um volume final de 25 µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (20pmol cada) conforme tabela 1, tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs e 1U de *Taq*. DNA polymerase (Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações envolveu um passo inicial de 5 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 57°C por 1min. e extensão a 72°C por 30 seg. A última etapa consistiu de extensão final a 72°C por 5 min. Em seguida, 10µL da reação foram submetidos à eletroforese por 40 minutos a 100V em gel de agarose a 1,5% corados com *BlueGreen*, visualizados e fotografados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Como controle positivo para detecção do gene codificadores de EE foram utilizadas as seguintes cepas de *S. aureus* ATCC® 13565 (*sea*), ATCC® 14458 (*seb*), ATCC® 19095 (*sec*), FRI 361 (*sed*), ATCC® 27664 (*see*) e N315 (*tst-1*). Como controle negativo utilizou-se DNA-Free Water (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados nas reações, tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) observados na PCR com as respectivas referências

| <i>Primer</i> | Sequência (5'-3') | Amplicon (pb) | Referência |
|---------------|---|---------------|-----------------------|
| <i>nuc</i> | F-GCGATTGATGGTGATACGGTT R-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC | 279 | KATEETE et al. (2010) |
| <i>sea</i> | F-CCTTTGGAA ACGGTTAAAACG R-TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC | 127 | BECKER et al. (1998) |
| <i>seb</i> | F-TCGCATCAAACCTGACAAACG R-GCAGGTA CTATAAGTGCCTGC | 477 | BECKER et al. (1998) |

| | | | |
|-------------|--|-----|------------------------|
| sec | F-AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG R-CACACTTTTAGAATCAACCG | 451 | MEHROTRA et al. (2000) |
| sed | F-CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG R-TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC | 319 | BECKER et al. (1998) |
| see | F-GCTGGAGGCACACCAAATA R-CATAACTTACCGTGGACCCTTC | 301 | MEHROTRA et al. (2000) |
| tst | F-ACCCCTGTTCCCTTATCATC R-TTTTCAGTATTTGTAACGCC | 326 | MEHROTRA et al. (2000) |
| blaZ | F- AAGAGATTTGCCTATGCTTC R- GCTTGACCACTTTTATCAGC | 517 | SAWANT et al. (2009) |
| mecA | F-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT R-TAATCTCATATGTGTTCCCTGTATTGGC | 155 | NAKAGAWA et al. (2005) |

Teste de resistência antimicrobiana

Realizou-se o teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) com a oxacilina (OXA $\geq 4\mu\text{L/mL}$) de acordo com a metodologia CLSI (2015). Como controle positivo da resistência à oxacilina foi utilizada a cepa ATCC[®] 43300 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Análise estatística

Os resultados dos testes de diagnóstico qualitativo (PCR) foram expressos em suas frequências absolutas e relativas (FIELD, 2009).

Resultados

Frequência de *S. aureus*

Dos 158 isolados selecionados inicialmente na prova da coagulase, 54 (34,1%) foram confirmados na prova molecular do gene *nuc*.

Pesquisa dos genes *blaZ* e *mecA* e teste de resistência antimicrobiana

23/54 (42,6%) de *S. aureus* analisados foram portadores do gene *blaZ*. Nenhum deles foi positivo na PCR para o gene *mecA*. No teste de concentração inibitória mínima, 4/54 (7,4%) isolados demonstraram resistência à oxacilina.

Pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst-1*

Nenhum dos 54 isolados de *S. aureus* submetidos à detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilócocicas foi positivo na PCR.

Discussão

Das 158 colônias típicas obtidas na análise microbiológica das amostras queijos coalho artesanais elaborados com leite de cabra, 54 (34,1%) foram confirmadas na prova molecular do gene *nuc* como *S. aureus*. Outros estudos já realizados com queijos elaborados com leite de cabra também destacaram *S. aureus* como um patógeno de impacto econômico e para saúde pública (CREMONESI et al., 2007; AKINEDEN et al., 2008; GANAI et al., 2016).

No presente estudo foi detectada a presença do gene *blaZ* em 42,6% (23/54) dos isolados. Esta resistência pode ocorrer por dois mecanismos, sendo o primeiro relacionado à produção de β -lactamase associado ao gene *blaZ* (LOWY, 2003) e o segundo devido a produção de PBP2a, uma proteína que se liga aos β -lactâmicos e está associada ao gene *mecA* (GUIGNARD et al., 2005). Como o gene *mecA* não foi identificado nos isolados deste estudo, acredita-se que a resistência ocorreu devido a produção de β -lactamase. Além disso, 7,4% (4/54) dos isolados foram resistentes à oxacilina na prova fenotípica e podem ser considerados *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA).

Os resultados obtidos quanto à ocorrência de isolados resistentes à oxacilina corroboram com os obtidos por França et al. (2012), que analisaram fenotípica e genotipicamente, 171 isolados de *Staphylococcus* spp. de leite de cabras com mastite subclínica nos Estados da Bahia e Pernambuco. Dos isolados 15,8% (27/171) apresentaram resistência fenotípica à oxacilina, mas

não foi detectado o gene *mecA* nesses isolados, além de ter sido constatado uma frequência de 40,2% do gene *blaZ* nesses mesmos isolados.

Peixoto et al. (2013) também realizaram estudos genotípicos e fenotípicos em isolados de *Staphylococcus* spp. de leite de cabras com mastite subclínica no Estado da Bahia. No estudo foi detectado 54,5% de resistência fenotípica, porém não houve detecção do gene *mecA* e 33,3% dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram portadores do gene *blaZ*.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo e dos supracitados, outros estudos relataram a detecção do gene *mecA* em *S. aureus* isolados de leite e queijo caprino (BASANISI et al., 2016; GANAI et al., 2016), além da relação desse gene e a resistência à oxacilina, como no estudo realizado por Obaidat et al. (2017) onde foi detectado o gene *mecA* em 11,9% (5/42) das amostras de tanques de expansão e 11,5% (3/26) das amostras de propriedades leiteiras. Todos os isolados portadores do *mecA* foram resistentes à oxacilina no teste de resistência a antimicrobianos.

Existem algumas hipóteses que podem justificar a resistência dos 7,4% (4/54) isolados de *S. aureus* obtidos neste estudo sem ter sido detectado o gene *mecA*. A primeira hipótese pode estar relacionada à possibilidade de existência de cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina em provas fenotípicas, mas que não portam o gene *mecA* fato este explicado pelo fenótipo de hiperprodução de β -lactamases (DE OLIVEIRA et al., 2000; BROWN, 2001). Outra hipótese segue na linha que esses isolados podem ser portadores da forma divergente do gene *mecA* denominado de gene *mecC*, que também confere resistência aos β -lactâmicos estáveis (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011).

Além das hipóteses supracitadas, ainda existe a possibilidade de ser outra linhagem de *S. aureus* resistente à oxacilina como é o caso da cepa MRSA ST130 que possui o gene *mecA* homólogo, mas que não é detectado na técnica convencional de PCR para *mecA* devido a sua conformação (PANTOSTI, 2012).

A maior preocupação em relação à saúde pública quanto as cepas de MRSA é devido as descobertas recentes que estas cepas podem colonizar animais, em especial bovinos e infectar o homem (JUHASZ-KASZANYITZKY et

al., 2007; KOCK et al., 2011). Isto também já foi identificado em outras espécies animais de companhia (LOEFFLER et al., 2005), equinos (CUNY et al., 2008) e suínos (GOMEZ-SANZ et al., 2010). Em relação à espécie caprina, estudos que avaliam a possibilidade de transmissão de cabras portadoras de cepas de MRSA para humanos ainda são escassos, mas em um estudo realizado na Áustria por Loncaric et al. (2013) constatou-se a possível transmissão de cepas de MRSA ST398 de caprinos para os humanos.

Em alimentos, o risco de veiculação de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina em leite e queijo caprino tem sido tratado como grave problema de saúde pública e animal, refletindo também na produção e segurança de alimentos (STASTKOVA et al., 2009; BASANISI et al., 2016; GANAI et al., 2016; OBAIDAT et al., 2017). Ainda existe a necessidade de mais estudo de MRSA em alimentos de origem animal, no que concerne a sua relação genética entre os clones isolados em alimentos com aqueles que causam infecções em humanos (KWON et al., 2005; PANTOSTI, 2012).

Neste estudo, não houve detecção de genes codificadores de EE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst-1*). *S. aureus* é a bactéria mais frequente em casos de surtos de intoxicação alimentar, podendo produzir mais de uma enterotoxina (OMOE et al., 2005). De maneira geral, os estudos observaram uma maior frequência dos genes clássicos em *S. aureus* isolados em produtos lácteos caprinos, sendo o gene *sec* o mais frequente (SCHERRER et al., 2004; AKINEDEN et al., 2008; XING et al., 2016).

A ausência de genes codificadores sugere que as amostras não constituem risco de intoxicação alimentar. Entretanto a presença de *S. aureus* nos queijos pode ser uma preocupação para as autoridades sanitárias, pois são considerados patógenos associados à manipulação e condições higiênicas inadequadas na obtenção e elaboração de alimentos (ARGUDIN et al., 2010), além de ter sido detectado gene de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e demonstrado resistência a oxacilina na MIC.

Conclusão

A elevada frequência de *S. aureus* portadores do gene *blaZ* e a identificação de cepas resistentes à meticilina é uma preocupação para a

saúde dos consumidores deste tipo de queijo. Os resultados também devem servir de alerta aos órgãos de Vigilância Sanitária sobre a baixa qualidade dos queijos artesanais elaborados com leite caprino nesta região do nordeste brasileiro.

Referência

AKBAS, M. Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. **International Journal of Food Science & Technology**. v.50, p.1666-1672, 2015.

AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHENEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v.124, p.211-216, 2008.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**. v.2, p.1751-1774, 2010.

BASANISI, M. G.; NOBILI, G.; LA BELLA, G.; RUSSO, R.; SPANO, G.; NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**. v.135, p.17-19, 2016.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. **Journal of Clinical Microbiology**. p.2548-2553, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 15/08/17.

BROWN, D. F. J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.48, p.65-70, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-third Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA. 2015.

CORDEIRO, P.R.C. Mercado do leite de cabra e de seus derivados. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v.12, n.39, p.32-43, 2006.

CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**. v.45, p.586-591, 2007.

CUNY, C.; STROMMINGER, B.; WITTE, W.; STANEK, C. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254 and ST398 in a veterinary hospital. **Microbial Drug Resistance**. v.14, p.307-310, 2008.

DE BUYSER A. L.; JANIN, F.; DILASSERF. Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie and Hygiene I**. v.14, p.677-678, 1985.

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.855-862, 2000.

FAN H .H.; KLEVEN S. H.; JACKWOOD M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary *primers* to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**. v. 39, p.729-735, 1995.

FIELD, A. Descobrimdo a estatística usando o SPSS. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FRANÇA, C. A.; PEIXOTO, R. M.; CAVALCANTE, M. B.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, C. J. B.; VESCHI, J. L. A.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.8, p.747-753, 2012.

GANAI, A. W. ; KOTWAL, S. K.; WANI, N.; MALIK, M. A.; JEELANI, R.; KOUR, S.; ZARGAR, R. Detection of *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.86, n.5, p.508–511, 2016.

GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infectious Diseases**. v.11, n.8, p.595-603, 2011.

GOMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; FERNANDEZ-PEREZ, R.; ASPIROZ, C.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, p.1269-1277, 2010.

GUIGNARD, B.; ENTENZA, J. M.; MOREILLON, P. β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Pharmacology**. v.5, p.479-489, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v.43, p.23, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> . Acesso em 05/05/17.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**. v.54, p.384-388, 2015.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**. v.7, p.997-1004, 2015.

JUHASZ-KASZANYITZKY, E.; JANOSI, S.; SOM-OGYI, P.; DAN, A.; VAN DERGRAAF-VAN BLOOIS, L.; VAN DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J. A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, p.630-632, 2007.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A. OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.9, p.23-29, 2010.

KOCK, R.; SIAM, K.; AL-MALAT, S.; CHRIST-MANN, J.; SCHAUMBURG, F.; BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W. Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. **Journal of Hospital Infection**. v.79, p.292-296, 2011.

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

LOEFFLER, A.; BOAG, A. K.; SUNG, J.; LIND-SAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pet small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56, p.692-697, 2005.

LONCARIC, I.; BRUNTHALER, R.; SPERGSERA, J. Suspected Goat-to-Human Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, n.5, p.1625-1626, 2013.

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

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.

MØRK, T.; KVITILE, B.; MATHISEN, T.; JØRGENSEN, H.J. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. **Veterinary Microbiology**. v.141, n.2, p.134-41, 2010.

NAKAGAWA, S.; TANEIKE, I.; MIMURA, D.; IWAKURA, N.; NAKAYAMA, T.; EMURA, T.; KITATSUJI, M.; FUJIMOTO, A.; YAMAMOTO, T. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentineleukocidin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.328, p.995-1002, 2005.

OBAIDAT, M. M.; BANI SALMAN, A. E.; ROESS, A. A. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1449-7>. 2017.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**. v.246, n. 2, p.191-198, 2005.

PANTOSTI, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**. v.3, p.1-12, 2012.

PATERSON, G.K.; LARSEN, A.R.; ROBB, A.; EDWARDS, G.E.; PENNYCOTT, T.W.; FOSTER, G.; MOT, D.; HERMANS, K.; BAERT, K.; PEACOCK, S. J.; PARKHILL, J.; ZADOKS, R. N.; HOLMES, M. A. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2809-2813, 2012.

PEIXOTO, R. M.; PEIXOTO, R. M.; ALVES, A. P. P.; PEIXOTO, L. J. S.; REGES, A. M.; COSTA, M. M. Genes de resistencia a antimicrobianos e producao de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de caprinos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**. v.20, p.343-344, 2013.

RAHBAR SAADAT, Y.; IMANI FOOLADI, A. A.; SHAPOURI, R.; HOSSEINI, M. M.; DEILAMI KHIABANI, Z. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus*

aureus in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v.6, n.5, p.345-349, 2014.

RUDKIN, J. K.; EDWARDS, A. M.; BOWDEN, M. G.; BROWN, E. L.; POZZI, C.; WATERS, E. M.; CHAN, W. C.; WILLIAMS, P.; O'GARA, J. P.; MASSEY, R. C. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. **Journal of Infectious Diseases**. v.205, p.798-806, 2012.

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

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

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.55, p.3765-3773, 2011.

STASTKOVA, Z.; KARPISKOVA, S.; KARPISKOVA, R. Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. **Veterinarni Medicina**. v.54, n.9, p.419-426, 2009.

WANG, X.; MENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, T.; ZHANG, Y.; YANG, B.; XI, M.; XIA, X. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p.142-147, 2012.

WIENEKEA, A.; GILBERT, J. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v.4, p.135-143, 1987.

XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; WANG, X.; GE, W.; WU, C. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**. v.59, p.644-650, 2016.

ZHANG, H. Z.; HACKBARTH, C. J.; CHANSKY, K. M.; CHAMBERS, H. F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. **Science**. v.291, p.1962-1965, 2001.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O queijo de coalho elaborado com leite de cabra é um dos patrimônios culturais e econômicos do Estado de Pernambuco, sendo uma importante fonte de renda e de geração de empregos. Entretanto estudos sobre sua qualidade microbiológica ainda são escassos, fato preocupante para saúde pública, uma vez que microrganismos patogênicos podem contaminar e serem veiculados pelo queijo de coalho caprino como foi constatado neste estudo. Todos os queijos coalho elaborados com leite caprino de Pernambuco analisados foram considerados impróprios para consumo de acordo com a RDC de nº12/2001. Além disso, observou-se o risco a saúde dos consumidores pelos isolados de MRSA veiculados pelos queijos coalho caprino. As informações obtidas neste estudo exaltam a importância de estudos microbiológicos de queijo coalho caprino, pois poderão dar suporte para possíveis medidas que visem à segurança alimentar e fiscalização do queijo caprino comercializado pelos órgãos de fiscalização responsáveis, já que, o consumo desses queijos analisados põe em risco a saúde dos consumidores.