

Dalila Lapinha Silva Oliveira

Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista *in vitro* frente a *Lactobacillus* spp.

Dissertação apresentada à UFMG,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal

Orientadora: Mônica Maria Oliveira
Pinho Cerqueira

Co-orientadora: Andréia Marçal da
Silva

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

Dissertação defendida e aprovada em 10 de julho de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente

Prof. Luiz Simeão do Carmo

Prof. Marcelo Resende de Souza

AGRADECIMENTOS

É com grande orgulho que concluo mais esta etapa da minha vida. Mas esta conquista com certeza não se realizou somente diante do meu esforço, mas sim da união de uma equipe e de pessoas que não me ajudaram diretamente na execução do projeto, mas com algum tipo de apoio, oração ou simplesmente um sentimento bom ou um bem querer.

Agradeço primeiramente a Deus pela vida que Ele me proporcionou, pela família na qual eu nasci e pelas pessoas maravilhosas que Ele tem colocado no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Jair e Magna, pelo amor e por todo esforço para garantia de uma boa formação acadêmica e profissional tanto para mim quanto para minha irmã. Ao meu pai pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas. À minha mãe pelo maior exemplo de trabalho e dedicação que eu poderia receber.

Agradeço à minha irmã, Fabíola, pela sua compreensão, companheirismo e amizade presentes desde a nossa infância e fortalecidos com o tempo.

Agradeço ao meu namorado, Bruno, pelo carinho, respeito e grande incentivo presente em todos os momentos. Sou uma pessoa muito grata a Deus por ter me dado esse presente de ter uma pessoa humilde, trabalhadora e de coração tão bom e puro no meu caminho.

Agradeço à minha querida Vó Lourdes, que já não está presente fisicamente, mas sim ao lado de Deus, olhando por mim e ajudando a guiar meus passos pelos caminhos da vida.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Mônica Cerqueira, pela orientação, amizade e pela confiança atribuída a mim desde o processo seletivo para a entrada no mestrado e que se estende até hoje em direção ao doutorado.

Agradeço ao Prof. Marcelo, que sempre esteve presente e disponível para me atender desde o sexto período da minha graduação, quando comecei a buscar os caminhos da inspeção. Tenho muita gratidão por todos os seus ensinamentos e admiro muito sua capacidade de se doar em prol do conhecimento. Seu exemplo profissional e pessoal será levado por mim por toda a vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Simeão, pela sua disponibilidade em ajudar sempre que preciso, pela disponibilização das bactérias de referência que precisei durante o meu experimento e pela participação nas bancas de seminário e de defesa de dissertação.

Agradeço à Prof^a. Andréia Marçal, por sua contribuição nas bancas de seminário e também como co-orientadora. Com certeza suas sugestões foram essenciais para a construção de um trabalho mais enriquecido.

Agradeço aos professores do DTIPOA, principalmente à Prof^a. Cláudia, à Prof^a Lílian e ao Prof. Leorges, pela contribuição na minha formação e disponibilidade sempre que preciso.

Agradeço aos técnicos de laboratório do DTIPOA, principalmente à Maura, ao Evaldo e ao César, sempre dispostos a ajudar quando necessário.

Agradeço ao Miltinho por seu trabalho em prol do Departamento.

Agradeço ao Léo por toda a sua ajuda, não só na fase de execução do experimento, mas também por sua contribuição científica e suas ótimas ideias. Este trabalho com certeza teria sido mais difícil sem o seu auxílio.

Agradeço aos meus alunos de Iniciação Científica, Felipe e Renata, por toda dedicação, atenção e eficiência. Tenho certeza que vocês vão longe!

Agradeço ao Sávio e aos demais colegas do LGMPP do ICB por toda colaboração no quesito molecular do meu trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia (EV-UFMG), em especial ao Bruno Brasil, pela realização das análises de sequenciamento.

Agradeço às meninas do Colegiado da pós-graduação em Ciência Animal, em especial à Luzete e à Deborah, pela disposição em ajudar sempre que necessário.

Agradeço aos meus amigos e colegas companheiros de pós, Denise Ribeiro, Letícia Oliveira, Flávia Lopes, Fernando Nogueira, Adriano Cunha, Camila Rodrigues, Marcela Brandão, Naiara Silva, Stefanne Gonçalves, Luiz Paulo Bastos e Tássia Ludmila, pela amizade e incentivo em todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos, em especial à Isabela Sabino, à Dalinne Chrystian, ao Michel Costa, à Lílian Ludmila e à Cristhiane Alkmim, por todo carinho, amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

Agradeço à FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES pela concessão da bolsa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste grande sonho.

SUMÁRIO	
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	13
2.2. Produção de toxinas por <i>Staphylococcus</i> spp.....	14
2.3. Surtos de intoxicação estafilocócica.....	16
2.4. Resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. a antimicrobianos.....	17
2.5. Bactérias ácido-láticas em queijos artesanais	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Identificação das amostras	25
4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	27
4.3. Antagonismo entre <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp.....	30
4.4. Pesquisa de genes codificadores da produção de toxinas.....	31
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1	Perfil bioquímico e identificação molecular das amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)	25
Tabela 2	Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. frente às amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)	30
LISTA DE QUADROS		
Quadro 1	Níveis de susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI	22
Quadro 2	Primers utilizados para a detecção por PCR dos genes <i>sea-see</i> e <i>tst</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de amostras de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)	24
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Perfil de resistência das amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra	27
Figura 2	Perfil de resistência das amostras de <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra	28
Figura 3	Perfil de resistência das amostras de <i>S. warneri</i> isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra	28
Figura 4	Perfil de resistência das amostras de <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra	29
Figura 5	Produto de amplificação por PCR dos genes <i>seb</i> (linha 2), <i>sec</i> e <i>sed</i> (linha 3) e <i>see</i> (linha 4)	32
Figura 6	Produto de amplificação por PCR dos genes <i>sea</i> (linha 2), <i>sec</i> e <i>sed</i> (linha 5) e <i>see</i> (linha 7)	32
Figura 7	Produto de amplificação por PCR do gene <i>tst</i> (linha 2)	32
ANEXO		
Anexo	Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA com as sequências depositadas <i>GenBank</i> , utilizando o algoritmo BLAST	42
LISTA DE ABREVIATURAS		
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (cultura de coleção tipo americano)	
BAL	Bactéria ácido-lática	
EUA	Estados Unidos da América	
FRI	<i>Food Researd Institute</i>	
FUNED	Fundação Ezequial Dias	
MG	Minas Gerais	
Mm	Milímetro	
ng/mL	Nanogramas por mililitro	

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
SE	Enterotoxina Estafilocócica
<i>se</i>	Gene codificador de enterotoxina estafilocócica
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico
<i>tst</i>	Gene codificador da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG) e identificadas ao nível molecular foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se *primers* específicos para a detecção de genes codificadores de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) e da Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Foi realizada PCR-Multiplex para detecção dos genes *sea*, *sec*, *sed* e *see*. Para *seb* e *tst*, foram realizadas PCR-Uniplex individualmente. Além disso, determinaram-se o perfil de susceptibilidade das amostras a antimicrobianos de diferentes bases e o teste de antagonismo *in vitro* entre *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. Genes codificadores de enterotoxinas clássicas, assim como de TSST-1, não foram amplificados. Em relação ao antibiograma, sulfonamida, penicilina, ceftazidima e oxacilina apresentaram os maiores percentuais de resistência (100, 80, 60 e 40%, respectivamente). Os demais antimicrobianos foram eficientes em percentuais acima de 70%. *Lactobacillus* spp. foram capazes de inibir o desenvolvimento *in vitro* de *Staphylococcus* spp. Conclui-se que as amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas não podem provocar intoxicação devido às toxinas clássicas ou à síndrome causada por TSST-1, possuem resistência principalmente às Sulfonamidas e aos β -lactâmicos, mas são sensíveis à maioria dos outros antimicrobianos comumente utilizados e seu desenvolvimento pode ser inibido por bactérias do gênero *Lactobacillus*.

Palavras chave: *Staphylococcus*, queijo artesanal, PCR-multiplex, antibiograma, antagonismo

ABSTRACT

Staphylococcus spp. samples isolated from artisanal Minas cheeses and molecularly identified were submitted to PCR using specific primers for the detection of classic enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) and toxic shock syndrome toxin-1(TSST-1). PCR-Multiplex was developed for the detection of *sea*, *sec*, *sed* and *see* genes. For *seb* and *tst*, PCR-Uniplex was developed individually. The antimicrobial susceptibility profile of the samples was also developed as the *in vitro* antagonism by *Lactobacillus* spp. Classic enterotoxin and TSST-1 genes were not amplified. Regarding the antibiogram, sulfonamide, penicillin, ceftazidime and oxacillin were the antimicrobials with higher resistance rates (100, 80, 60 e 40%, respectively). The studied *Staphylococcus* spp. tested had an efficiency rate above 70%. *Lactobacillus* spp. were able to inhibit *Staphylococcus* spp. *in vitro* development. The studied bacteria had not presented classic enterotoxin and TSST-1 genes. Therefore, they are not able to cause food borne intoxication by these enterotoxins. Also, they were sensitive to the most common antimicrobials tested and were inhibited by *Lactobacillus* spp.

Keywords: *Staphylococcus*, artisanal cheese, PCR-multiplex, antibiogram, antagonism

1. INTRODUÇÃO

O queijo artesanal produzido no Brasil surgiu no período colonial e sua produção se estende até os tempos atuais, conservando as características tradicionais da região da qual é proveniente e constituindo fonte de renda para pequenos produtores rurais. Entretanto, devido às características do seu processamento e à sua matéria-prima ser o leite cru, não tratado termicamente, esse queijo pode veicular bactérias potencialmente patogênicas, além de suas toxinas, o que pode trazer risco à saúde de quem o consome.

Nesse contexto, *Staphylococcus* spp. estão entre os micro-organismos potencialmente patogênicos mais encontrados em queijos artesanais. Esses micro-organismos são agentes patogênicos muito comuns, responsáveis pela produção de enterotoxinas termo-resistentes em alimentos contaminados, o que constitui em importante fonte de intoxicação alimentar. Devido às suas características de desenvolvimento peculiares, essa bactéria está amplamente distribuída na natureza, sendo transmitida aos alimentos por manipuladores, principalmente pelos portadores assintomáticos, e também pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite por *Staphylococcus* spp. (Jay, 2005).

A intoxicação estafilocócica, causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp., é uma das doenças mais comumente transmitidas por alimentos, considerando-se o número anual de casos ou surtos e sua ocorrência mundial. Porém, a incidência real dessa enfermidade não é conhecida porque seus sintomas são relativamente brandos e normalmente desaparecem em poucas horas, motivo pelo qual a maioria das pessoas acometidas não procura atenção médica e os casos não são relatados às autoridades de saúde. Por isso, acredita-se que a frequência dos casos seja 10 a 200 vezes maiores que o número oficial

relatado (Muller, 2002). Outro agravante relativo às enterotoxinas estafilocócicas é que estas são resistentes a altas temperaturas e às enzimas digestivas (Murray et al., 2000; Le Loir et al., 2003). Além das enterotoxinas, *Staphylococcus* spp. também são apontados como produtores da Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), reconhecida como principal causa da Síndrome do Choque Tóxico em seres humanos, caracterizada por febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (Bergdoll e Chesney, 1991).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente aplicada como um método bastante eficiente para a detecção dos genes responsáveis pela codificação da produção de toxinas. Uma variação da PCR, a PCR-Multiplex, permite em uma mesma reação, detectar diferentes genes responsáveis pela codificação da produção de diferentes toxinas, o que contribui de uma forma mais rápida e precisa para o estudo epidemiológico de *Staphylococcus* spp. e seu potencial para envolvimento em intoxicações alimentares (Becker et al., 1998). A detecção de genes toxigênicos pode indicar a real possibilidade de determinada amostra produzir a toxina, mesmo que essa característica não esteja sendo expressa e, conseqüentemente, a toxina não esteja sendo produzida (Schimitiz et al., 1998).

Outra preocupação em relação a *Staphylococcus* spp. veiculados pelos alimentos seria a resistência destes aos antimicrobianos. A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública que é afetado pelo uso indiscriminado dessas substâncias em humanos e em animais, tendo como consequência seu desenvolvimento e propagação para outros micro-organismos (Costa, 2010b), inclusive os patogênicos.

A microbiota dos queijos artesanais se revela bastante complexa e pode ser

composta tanto por micro-organismos considerados indesejáveis como por micro-organismos considerados desejáveis. Nesse contexto, o grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) constitui um importante exemplo de micro-organismo benéfico, tendo em vista que são capazes de produzir substâncias inibitórias e, consequentemente, desfavorecer o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, como as bactérias patogênicas. Além disso, as BAL podem também desempenhar outras funções, como a produção de ácidos orgânicos e de outros compostos químicos responsáveis pelo sabor característico do produto. Um importante gênero pertencente ao grupo das BAL é *Lactobacillus*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG) e identificação ao nível molecular quanto à presença de genes codificadores da produção das enterotoxinas clássicas e da TSST-1, quanto à susceptibilidade a antimicrobianos de diferentes bases e quanto ao possível antagonismo frente a *Lactobacillus* spp..

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Staphylococcus* spp.

A primeira descrição de cocos que se agrupavam como cachos de uva relacionados a diversas doenças no homem ocorreu em 1880, mas somente em 1882 foram denominados “*Staphylococcus*” de acordo com o grego, *Staphyle* (cachos de uvas) e *coccus* (grão ou baga) (Baird Parker, 1990).

Bactérias pertencentes a esse gênero apresentam-se na forma de cocos Gram positivo, isolados ou agrupados em pares, tétrades ou cachos. São anaeróbias facultativas, não esporuladas, imóveis e produtoras da enzima catalase. Além disso,

são mesófilas e halofílicas, podendo resistir a uma concentração de 15% de cloreto de sódio. Em meio sólido, suas colônias são circulares, convexas e apresentam uma coloração que varia do branco ao alaranjado (Kloss, 1990; Muller, 2003).

Entre as características apontadas como fatores de virulência de *Staphylococcus* estão a capacidade de produção de enzimas, como a coagulase, a termonuclease e a hemolisina, e a fermentação de açúcares, como manitol e maltose. A termonuclease ou desoxirribonuclease apresenta estabilidade térmica e é capaz de hidrolisar o ácido nucléico (DNA) (Lachica et al., 1969). A coagulase é produzida durante o metabolismo microbiano e é capaz de coagular o sangue humano e de animais por ativação da protrombina, o que ocasiona a conversão de fibrinogênio em fibrina (Mac Faddin, 1980). Assim, esse fator enzimático provoca um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro (Madigan et al., 1997). Essas provas bioquímicas, como a pesquisa de coagulase, pesquisa de termonuclease, hemólise em ágar sangue e fermentação de carboidratos, entre outros, têm sido utilizadas na identificação de espécies. Em relação à coagulase, somente as espécies *Staphylococcus aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas amostras de *S. hyicus* são coagulase positivo, a maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativo (Silva et al., 2010). Por muito tempo, o único teste utilizado para identificação de *S. aureus* era a produção de coagulase em tubo, análise que está sujeita a muitas variações de acordo com o tempo de incubação, a origem do plasma utilizado ou o grau de coagulação (Berke e Tilton, 1986). Assim, atualmente, o desenvolvimento de técnicas moleculares tem permitido uma identificação mais precisa, com percentuais de certeza acima de 99%.

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi melhor esclarecida nos últimos anos graças ao emprego das técnicas moleculares, que permitiram relacionar ou comparar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos, o que possibilitou a descrição de novas espécies e reclassificações mais adequadas. Entre esses métodos, a análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de micro-organismos. Um exemplo dessas macromoléculas é o RNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos e altamente conservado entre as bactérias (Lange et al., 2011). O sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S tem sido frequentemente utilizado com finalidade taxonômica e filogenética (Becker et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte e Caliendo, 2003). As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Ribosomal Differentiation of Microorganisms* (RIDOM) (Becker et al. 2004), obtendo-se, assim, a identificação do micro-organismo analisado.

2.2. Produção de toxinas por *Staphylococcus* spp.

Devido às suas características, *Staphylococcus* spp. exibem alta capacidade de contaminação, desenvolvimento e produção de toxinas nos alimentos, o que expõe a população consumidora ao risco de intoxicação alimentar. Assim, as legislações mundiais que versam sobre os parâmetros microbiológicos de alimentos, tais como a Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), preconizam a pesquisa de estafilococos coagulase positivo, pois essa enzima apresentaria correlação com a produção de toxinas. Contudo, a produção desse metabólito por espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo já foi relatada por

autores no Brasil (Sena, 2000; Carmo et al., 2002; Lamaita et al., 2005; Guedes Neto et al., 2005; Veras et al., 2008) e em trabalhos internacionais (Valle, 1990; Rodriguez et al., 1996), o que indica a necessidade de uma revisão na atual legislação vigente.

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram positivo e posteriormente liberadas para o ambiente extracelular. São decorrentes da multiplicação e metabolismo dos micro-organismos. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem na transmissão normal de impulsos nervosos e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As principais exotoxinas produzidas por *Staphylococcus* são as enterotoxinas (SE), responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica no homem, a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), responsável pela Síndrome do Choque Tóxico e as Toxinas Esfoliativas, responsáveis pela Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada (Andrade, 2008).

A produção das enterotoxinas representa um risco potencial à saúde pública, pois, ao serem ingeridas juntamente com os alimentos contaminados, podem levar a um quadro de gastroenterite aguda. Além disso, essas toxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (Le Loir et al., 2003), e são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos (Murray et al., 2000), não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (Jay, 2005). Em queijos, a quantidade de toxina produzida a partir de contagens de *Staphylococcus* spp. acima de 10⁵ UFC/g seria suficiente para desencadear um quadro de intoxicação (Le Loir et al., 2003). Em leite cru, Carmo et al. (2002) mostraram a

produção de toxinas em contagens de $2,4 \times 10^3$ UFC/mL, o que ratifica o risco de intoxicação causado pela ingestão desse tipo de alimento e de seus derivados. Além disso, algumas amostras de *S. aureus* podem produzir quantidades detectáveis de enterotoxinas após 24 horas de incubação a 30°C (Pereira et al., 1991).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre após ingestão de toxinas produzidas e liberadas durante o desenvolvimento e a multiplicação do micro-organismo no alimento contaminado. Essa doença é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Além disso, Pode resultar em desidratação decorrente da perda significativa de líquido, sudorese e cefaleia, geralmente não acompanhada de febre (Murray et al., 2000). Entretanto, o quadro é frequentemente auto-limitante, durando entre 24 e 48 horas (Veras et al., 2004), o que dificulta a procura por centros de saúde e, conseqüentemente, o relato dos casos.

Os genes que codificam as enterotoxinas foram denominados iniciando-se com as letras *se* de enterotoxina estafilocócica ou *ent* de enterotoxina, sendo a primeira forma a mais utilizada na atualidade (Freitas et al., 2004). Com base em características antigênicas, diferentes enterotoxinas estafilocócicas foram identificadas. As toxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE representam tipos clássicos (Betley e Mekalanos, 1988; Bayles e Iandolo, 1989). Quatro enterotoxinas adicionais (SEG, SEH, SEI e SEJ) foram descritas, além de seus genes correspondentes (Munson et al., 1998). Posteriormente, novos genes que codificam as enterotoxinas foram descobertos, ampliando a variedade de toxinas: SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU e SEV (Jaurrad et al., 2001; Letertre et al., 2003). Além disso, algumas variantes também foram relatadas para SEC, SEG, SEI e SEU (Letertre et al., 2003).

Staphylococcus spp. também estão envolvidos na produção da Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), que é a principal causa da síndrome do choque tóxico. Essa doença é caracterizada por um quadro agudo e potencialmente fatal que se apresenta com febre alta, eritemas difusos e descamação da pele, além de hipotensão e alterações em diversos órgãos (Bergdoll e Chesney, 1991). Inicialmente, a Síndrome do Choque Tóxico foi associada à utilização de absorventes internos por mulheres em período menstrual e à colonização da mucosa vaginal por *S. aureus*. A ausência de bacteremia nessas pacientes sugeriu que a doença seria resultado de uma intoxicação por produtos elaborados pelo micro-organismo. Mais recentemente, a síndrome foi também associada a infecções cutâneas, partos, abortos, infecções pós-cirúrgicas e uso de materiais contaminados em curativos, podendo acometer igualmente pessoas de ambos os sexos (Dinges et al., 2000).

Além das toxinas anteriormente descritas, existem relatos da produção de toxinas esfoliativas por *Staphylococcus* spp., que são responsáveis por provocar a Síndrome da Pele Escaldada. O quadro se inicia com uma lesão de pele superficial e evolui para lesões bolhosas com exsudato purulento, acometendo principalmente neonatos, crianças e adultos com infecções latentes (Luz, 2008).

Atualmente, com o avanço da ciência e a aplicação de métodos cada vez mais acurados na prevenção e no controle de doenças, foi possível o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar a possibilidade de determinada amostra de *Staphylococcus* produzir toxina. A tecnologia de DNA recombinante, assim como o advento da amplificação *in vitro* pela PCR, que permite obter, rapidamente, grandes quantidades de cópias de um segmento de DNA específico, foram capazes de potencializar métodos de análise

baseados em sequências de ácidos nucleicos. A aplicação dessas metodologias originou diversos estudos na busca de métodos mais eficazes de diferenciação, identificação e caracterização de micro-organismos (Gandra, 2003).

Assim, a PCR pode ser aplicada como um método para a detecção dos genes responsáveis pela codificação da produção de toxinas. Uma variação da PCR, a PCR-Multiplex, permite numa mesma reação, detectar diferentes genes responsáveis pela codificação de diferentes toxinas, o que contribui de uma forma mais rápida e precisa para o estudo epidemiológico de *Staphylococcus* spp. e seu potencial para envolvimento em intoxicações alimentares (Becker et al., 1998; Luz, 2008). A detecção de genes toxigênicos pode indicar a real possibilidade de determinada amostra produzir a toxina, mesmo que essa característica não esteja sendo expressa e, consequentemente, a toxina não esteja sendo produzida (Schimitz et al., 1998).

2.3. Surto de intoxicação estafilocócica

Vários relatos foram descritos na literatura acerca de intoxicações estafilocócicas relacionadas ao consumo de queijos artesanais. Em julho de 1987, em Ouro Preto (MG), houve um surto de intoxicação alimentar em quatro pessoas de uma mesma família atribuído à contaminação do queijo Minas frescal por *S. aureus* ao nível de $9,3 \times 10^7$ UFC/g, com detecção de bactérias produtoras de SEA, SEB, SED e SEE. Entre os sintomas apresentados pela família, incluem-se náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, o que caracteriza a intoxicação (Sabioni et al., 1988).

Em Minas Gerais, entre novembro de 1991 e outubro de 1992, foram relatados cinco surtos de intoxicação estafilocócica associados ao consumo de queijo frescal. Além disso, de agosto de 1991 até 1995,

houve predomínio das intoxicações estafilocócicas nos surtos de doenças transmitidas por alimentos, além de acentuado envolvimento de queijos como causa (Câmara, 2002).

Em 1996, ocorreu um surto relacionado à ingestão de queijo Minas frescal envolvendo sete pessoas da mesma família. A partir da análise desse alimento, foi possível detectar contagens de $2,9 \times 10^8$ UFC/g de *S. aureus*, sendo detectadas amostras produtoras de SED. Nessa mesma amostra, foram detectados 180ng/g de SEH (Pereira et al., 1996).

No período de 1997 a 2002, totalizaram-se 18 surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos em Minas Gerais, cuja causa foi atribuída ao consumo de leite e produtos lácteos analisados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). De acordo com os resultados, foi constatado que os principais agentes envolvidos nesses surtos foram *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo enterotoxigênicos. As principais toxinas envolvidas foram SEA, SEB e SEC. O queijo ocupou lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos nos surtos, veiculando principalmente esses micro-organismos, o que pode ser explicado por esse alimento ser um produto muito manipulado durante o seu processo de produção, além de agravantes como condições higiênico-sanitárias inadequadas, principalmente em queijos elaborados de forma artesanal e sem inspeção sanitária (Veras et al., 2003).

Em 1999, dois surtos de intoxicação alimentar foram notificados aos serviços de saúde das cidades de Manhuaçu e Passa Quatro (MG). O primeiro acometeu 50 pessoas, que apresentaram diarreia, vômitos, tonturas, calafrios e dores de cabeça, sintomas apresentados após a ingestão de queijos produzidos a partir de leite cru. O segundo acometeu 328 pessoas, que apresentaram diarreia e vômito decorrentes

do consumo de leite cru. Amostras tanto do queijo quanto do leite confirmaram altas contagens de *S. aureus* e, ainda, a presença de SEA, SEB e SEC (Carmo et al., 2002).

No Brasil, são poucas as informações oficiais quanto à incidência de doenças transmitidas por alimentos. Segundo Pereira et al. (1996), as intoxicações estafilocócicas são muito comuns no país, sendo a maioria dos casos não investigada ou não notificada. De acordo com o Instituto Pan-Americano de Proteção dos Alimentos e Zoonoses, entre os anos de 1993 e 2002, ocorreram 18 surtos notificados de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos, sendo dois deles o leite. Desse total, 93 pessoas ficaram doentes e não foram notificados óbitos (Santana et al., 2010). Nesse mesmo período, foram relatados 86 casos de intoxicação por queijos contendo *S. aureus*. Segundo relatos da FUNED, no período de 1995 a 2001, em Minas Gerais, 12.820 pessoas foram intoxicadas e 17 morreram após consumo de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas por *S. aureus*. Destes, 23 ocorreram em função da ingestão de queijos diversos, com 660 pessoas acometidas e um óbito (Carmo et al., 2002). Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (2003), a real frequência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, seja por erro diagnóstico, por ser similar a outras intoxicações (como a causada pela toxina do vômito, produzida por *Bacillus cereus*); por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. No estado de São Paulo foram notificados 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas nos anos de 2001 e 2002. Felizmente, não houve relato de óbito.

Os dados publicados infelizmente são subestimados devido, principalmente, à falta de notificação dos surtos às autoridades públicas. Portanto não refletem o risco real ao qual os consumidores de produtos

elaborados a partir de leite cru estão submetidos.

Diversos trabalhos desenvolvidos no Brasil abordam a qualidade microbiológica dos queijos artesanais e os resultados mostram uma realidade alarmante. Resende (2010) avaliou queijos provenientes de 18 propriedades rurais da região da Serra da Canastra, produzidos em queijarias cadastradas e não cadastradas pelo órgão de fiscalização estadual, e encontrou elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. nas duas situações, com média de $1,7 \times 10^8$ UFC/g. Resultados semelhantes envolvendo queijo Minas artesanal e elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. podem ser encontrados em diversos trabalhos na literatura (Borelli, 2002; Brant, 2003; Araújo, 2004; Ornelas, 2005; Pereira et al., 2008; Menezes et al., 2009; Borelli et al., 2011), o que causa uma grande preocupação tendo em vista o potencial que esse micro-organismo apresenta de produzir enterotoxinas nessas condições.

2.4. Resistência de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos

Staphylococcus spp. são as bactérias de interesse clínico que mais precocemente chamaram a atenção pela resistência aos antimicrobianos. Além disso, cada novo antimicrobiano, têm surgido linhagens de bactérias resistentes, com o agravante do efeito cumulativo e a consequente multirresistência (Muller, 2003).

Na década de 1940, a penicilina era a droga de escolha em infecções estafilocócicas; porém, a resistência a essa droga foi relatada pouco tempo depois. Em 1959, iniciou-se o emprego de metilina e outras penicilinas semi-sintéticas, tais como oxacilina, resistentes à ação de penicilinasas. Contudo, em 1960 surgiu o primeiro caso de *Staphylococcus* metilina-resistentes. Os termos MRSA/ORSA referem-se aos micro-organismos resistentes à metilina/oxacilina

e VISA, aos que possuem sensibilidade reduzida à vancomicina (Andrade, 2008). Espécies de *Staphylococcus* possuem grande capacidade em adquirir resistência a vários tipos de antimicrobianos, o que pode ser atribuído ao uso abusivo dessas drogas. A utilização, muitas vezes indiscriminada, dessas substâncias estimula a evolução bacteriana em direção à capacidade de resistência e possibilita a transmissão desta às novas gerações. A presença marcante de *Staphylococcus* em leite e derivados pode ser atribuída à elevada resistência aos antimicrobianos utilizados comumente na terapia da mastite bovina (Veras, 2004). A produção leiteira vem baseando-se principalmente na terapêutica alopática, e o aumento do uso de antimicrobianos ocorre em função da persistência de certos micro-organismos resistentes. Dentre eles, *S. aureus* é um dos mais patogênicos e causa uma infecção na maioria das vezes crônica, diminuindo gradativamente a produção leiteira, sendo de difícil controle uma vez que apresenta geralmente resistência à penicilina e outros antibióticos comumente utilizados (Luz, 2008). De acordo com Fagundes e Oliveira (2004), o tratamento de mastite por *S. aureus* é muito difícil devido à elevada resistência a antimicrobianos apresentada por bactérias dessa espécie.

Algumas espécies de bactérias apresentam resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos. A resistência natural pode ocorrer por variação da permeabilidade da parede celular para diferentes drogas, por produção de enzimas que as degradam ou modificam ou por modificação espontânea de cromossomas de genes alvos dos antimicrobianos (Costa, 2010b). A resistência adquirida pode ocorrer pela aquisição de genes (normalmente situados em elementos transmissíveis, como plasmídios ou transposons), por recombinação de DNA exógeno no cromossoma da bactéria ou, ainda, por mutação (Palermo Neto e Almeida, 2006). Micro-organismos resistentes a

antimicrobianos veiculados por alimentos podem transferir genes de resistência a outros indivíduos presentes no trato gastrointestinal, inclusive bactérias potencialmente patogênicas (Witte, 2000), o que causa grande preocupação tendo em vista o risco para a segurança alimentar. A resistência bacteriana a antimicrobianos é um sério problema para a saúde pública, pois bactérias resistentes podem ser transmitidas ao homem por meio da ingestão de alimentos contaminados (Luz, 2008).

2.5. Bactérias ácido-láticas em queijos artesanais

O queijo artesanal tradicional feito nas fazendas emprega como fermento o “pingo” (soro fermentado originado da produção de queijo do dia anterior). Esse fermento endógeno, utilizado como cultura iniciadora, geralmente apresenta altas contagens de BAL, mas pode apresentar também contagens consideráveis de bactérias potencialmente patogênicas, podendo ser uma importante fonte de contaminação para esse tipo de queijo (Nóbrega et al., 2008). Além disso, como a quantidade desse fermento adicionada ao leite pode variar de fazenda para fazenda, diferentes concentrações desses micro-organismos podem estar presentes na massa do produto, o que pode causar variações na intensidade e na velocidade de fermentação, no teor de lactose transformada em ácido lático e, conseqüentemente, na acidez desenvolvida (Machado et al., 2004).

As BAL constituem importante exemplo de micro-organismos desejáveis presentes nos diferentes tipos de queijo, pois podem desempenhar importantes funções, como a produção de ácidos orgânicos e de outros compostos químicos responsáveis pelo sabor característico do produto, além de substâncias antagonistas aos micro-organismos indesejáveis, entre elas as bacteriocinas, que podem apresentar diferentes atividades bactericidas ou

bacteriostáticas, agindo contra a microbiota indesejável (Ross et al., 2002; Riley e Wertz, 2003).

As bacteriocinas são polipeptídeos antimicrobianos sintetizados no ribossomo e secretados pela célula bacteriana (Chin et al., 2001). Seu mecanismo de ação consiste na formação de poros na membrana citoplasmática, o que leva a uma alteração do equilíbrio osmótico, resultando em morte celular (Cleveland et al., 2001). Essas substâncias apresentam espectro de atividade contra bactérias Gram positivo, incluindo-se micro-organismos patogênicos importantes, como os *Staphylococcus* spp.

Segundo Jay (2005), o grupo das BAL compreende 13 gêneros de bactérias Gram positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Resende et al. (2011) encontraram *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* como os principais micro-organismos isolados das amostras de leite, soro-fermento e queijo artesanal da região da Serra da Canastra (MG), além de *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e outras espécies de *Lactobacillus*.

As BAL são consideradas micro-organismos benéficos e contribuem para a realização das alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação do queijo: são responsáveis pela transformação da lactose em ácido láctico, e suas enzimas contribuem na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades sensoriais do produto final. As BAL podem ser adicionadas no início da fabricação, ou podem ser utilizadas aquelas que já ocorrem naturalmente no leite, como ocorre no caso dos queijos artesanais (Beresford et al., 2001). Assim, esse tipo de micro-organismo desejável contribui para a

formação das características intrínsecas, além de favorecer também a conservação e a segurança higiênico-sanitária dos queijos.

Várias substâncias antimicrobianas podem ser produzidas por bactérias Gram positivo, incluindo as BAL, entre elas os ácidos orgânicos (como ácido láctico), o peróxido de hidrogênio, o dióxido de carbono, o diacetil, o acetaldeído e as bacteriocinas (Naidu et al., 1999; Guedes Neto et al., 2005). A ação antagonista das BAL contra micro-organismos indesejáveis, inclusive *Staphylococcus* spp., em alimentos tem sido descrita em vários trabalhos (Vaughan et al., 1994; Fang et al., 1996; Uraz et al., 2001; Alexandre et al., 2002; Caridi, 2003; Guedes Neto et al., 2005), o que revela a grande importância desse grupo na microbiota de produtos artesanais sob o ponto de vista da segurança alimentar.

Abo-Amer (2007) avaliou a capacidade antagonista de amostras de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de queijo artesanal egípcio e verificou forte inibição em relação a *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*, além de outros micro-organismos patogênicos. Costa (2010a) e Andrade (2012) avaliaram a atividade antagonista *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra frente a bactérias de referência, entre elas *S. aureus*, e verificaram elevada capacidade de inibição principalmente dos microrganismos do gênero *Lactobacillus*.

Além dos trabalhos acima citados, que demonstram a atividade antagonista *in vitro* de bactérias ácido-láticas sobre *Staphylococcus* spp., é possível que esses microrganismos benéficos sejam capazes de minimizar o potencial toxigênico de *Staphylococcus* spp. presentes em uma mesma microbiota, como mostrado por Seridan et al. (2012). Nesse trabalho, foram produzidos queijos experimentais inoculados por *Lactococcus lactis* e por *S. aureus* produtor de enterotoxina B e foi observado

que, além de alterar o comportamento original de crescimento do *S. aureus*, a presença de *L. lactis* pode ter inibido a sua produção de enterotoxina.

Dados interessantes também foram apresentados por Pribull et al. (2011), que avaliaram a ação de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. sobre 30 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Todas as amostras apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das quatro bacteriocinas testadas, o que revela, mais uma vez, o grande potencial de inibição das bactérias ácido-láticas sobre *Staphylococcus* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aquisição das amostras

Foram utilizadas 16 amostras de *Staphylococcus* spp. previamente isoladas de queijos artesanais provenientes de propriedades rurais localizadas na região da Serra da Canastra (MG). Em seguida ao isolamento, as amostras foram armazenadas em meio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Difco, Kansas, EUA*) e glicerol e submetidas ao congelamento (-20°C), onde permaneceram conservadas desde então.

3.2. Caracterização bioquímica

Após o descongelamento, 100µL de cada amostra foram coletados e adicionados a tubos contendo 4mL de caldo BHI, e incubados por 24 horas a 37°C. Após a ativação dos micro-organismos, estes foram inoculados em placas contendo ágar Baird Parker (BP) (*Difco, Kansas, EUA*), de onde, após incubação por 48 horas a 37°C, foram coletadas as colônias para o teste de Gram e para o teste de produção da catalase. A partir dos cultivos em caldo BHI, as amostras foram submetidas às provas de coagulase livre e termonuclease, segundo Silva et al.

(2010), e fermentação aeróbica do manitol segundo Bergey e Holt (1994).

3.3. Identificação dos micro-organismos isolados por biologia molecular

A extração do DNA total dos micro-organismos isolados foi realizada a partir do cultivo recente em caldo BHI, incubado sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas. De cada cultivo dos micro-organismos que cresceram, 5mL foram centrifugados a 3000g durante 10 minutos, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* obtidos foram suspensos em 1mL de cloreto de lítio (1M), transferidos para tubos *Eppendorf* e incubados sob agitação a 37°C, por uma hora, com a finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000g, durante 10 minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os *pellets* obtidos foram suspensos em um mL de tampão para protoplastos (50mM Tris HCl pH 8,0; 10mM EDTA e 10mg de lisozima mL⁻¹), sendo 200µL de enzima e 800µL de tampão com RNase, e incubados por uma hora, sob agitação, a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 14000g durante um minuto e os sobrenadantes foram descartados.

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (*Promega Corporation, Wisconsin, EUA*), segundo instruções do fabricante.

Com o objetivo de visualizar o DNA total extraído na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Um volume de 5µL de cada amostra de DNA total extraído foram misturados a 1µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, encaminhados à eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de brometo de etídeo (1%), utilizando 100V, durante 60 minutos. Ao

término da corrida, o gel foi fotografado, utilizando equipamento de foto-documentação com luz ultravioleta.

Posteriormente, as amostras de DNA bacteriano extraídas foram amplificadas por meio de PCR conforme descrito a seguir (Lange et al., 2011).

Reação de PCR rDNA 16S:

DNA total diluído	5 µL
PCR Master Mix 2x*	25 µL
Iniciador 16S senso**	3 µL
Iniciador 16S reverso***	3 µL
Água deionizada	14 µL

*Promega Corporation

**Primer 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCA - 3'

***Primer 3' – GTCGTCGGCGCCATTATG – 5'

Em seguida, os tubos *Eppendorf* contendo as amostras foram colocados dentro de uma máquina termocicladora *Veriti™ 96 – Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*,

Califórnia, EUA), sendo utilizado o seguinte programa:

Desnaturação	94°C	5 minutos
	94°C	1 minuto
Anelamento	53°C	1 minuto
Extensão	72°C	1 minuto e 30 segundos
Extensão final	72°C	10 minutos
	4°C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão: 25

Após a reação, cinco µL de cada produto de PCR foram misturados a um µL do tampão glicérol com azul de bromofenol e então submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,5%), adicionado de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, por 90 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas. A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o auxílio do *Kit Wirard SV Gel and PCR Clean-up System* (*Promega Corporation*, Wisconsin, EUA).

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em aparelho ABI3130 (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA), utilizando-se polímero POP7 e *BigDye* v.3.1, realizado pela Valid Biotecnologia do Laboratório de Genética Animal do

Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária - UFMG. As sequências foram lidas com auxílio do programa *Codon Code Aligner* (*CodonCode Co*, Massachusetts, EUA) e do algoritmo BLAST (Zhang et al., 2000).

3.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade, pelo princípio de difusão da droga, utilizando-se discos e medindo-se o diâmetro dos halos de inibição conforme proposto inicialmente por Bauer et al. (1966), preconizado pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) e publicado pela ANVISA (ANVISA, 2005).

Após ativação em caldo BHI, as amostras de *Staphylococcus* spp. foram cultivadas em ágar BHI, sendo, posteriormente, transferidas para tubos contendo 3,5 mL de salina 0,85% para obter-se concentração correspondente a 0,5 na escala Mc Farland (10^8 UFC/mL). Em seguida, foram feitos inóculos utilizando-se zaragatoas sobre a superfície de placas tipo pizza (14cm de diâmetro) contendo o mesmo ágar. Logo após, foram distribuídos os discos (*Laborclin*, Paraná, Brasil) contendo os antimicrobianos. As placas foram incubadas em aerobiose, durante 24 horas a 35°C.

Foram utilizadas as seguintes drogas e suas respectivas concentrações: ciprofloxacina 5µg, penicilina G 10U, cloranfenicol 30µg, vancomicina 30µg, ceftazidima 30µg, gentamicina 10µg, estreptomicina 10µg, tetraciclina 30µg, oxacilina 1µg, clindamicina 2µg, eritromicina 5µg, ampicilina 10µg, sulfazotrim 25µg, imipenema 10µg, cefoxitina 30µg,

amicacina 30µg, ceftriaxona 30µg, cefaclor 30µg, amoxicilina 10µg, nitrofurantoína 300µg e sulfonamida 300µg.

Após a incubação, com auxílio do paquímetro digital (*Mitutoyo Digimatic Caliper*, *Mitutoyo Sul Americana Ltda.*, São Paulo, Brasil), foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. A cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como micro-organismo controle neste teste.

Nesse caso, os resultados não foram submetidos à análise estatística, pois os resultados expressos de forma quantitativa foram utilizados para uma classificação qualitativa dos micro-organismos como sendo sensíveis, intermediários ou resistentes às drogas antimicrobianas testadas, de acordo com o 15º suplemento informativo da ANVISA (2005) que pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1. Níveis de susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI

Antimicrobiano	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ciprofloxacina (5µg)	≤ 15	-	≥ 21
Penicilina G (10U)	≤ 28	-	≥ 29
Cloranfenicol (30µg)	≤ 12	-	≥ 18
Vancomicina (30µg)	-	-	≥ 15
Ceftazidima (30µg)	≤ 14	15 a 17	≥ 18
Gentamicina (10µg)	≤ 12	13 a 14	≥ 15
Tetraciclina (30µg)	≤ 14	15 a 18	≥ 19
Oxacilina (1µg)	≤ 10	11 a 12	≥ 13
Clindamicina (2µg)	≤ 14	15 a 20	≥ 21
Eritromicina (5µg)	≤ 13	14 a 22	≥ 23
Ampicilina (10µg)	≤ 28	-	≥ 29

Sulfazotrim (25µg)	≤ 10	11 A 15	≥ 16
Imipenema (10µg)	≤ 13	14 a 15	≥ 16
Cefoxitina (30µg)	≤ 19	-	≥ 20
Amicacina (30µg)	≤ 14	15 a 16	≥ 17
Ceftriaxona (30µg)	≤ 13	14 a 20	≥ 21
Cefaclor (30µg)	≤ 14	15 a 17	≥ 18
Amoxicilina (10µg)	≤ 28	-	≥ 29
Nitrofurantoína (300µg)	≤ 14	15 a 16	≥ 17
Sulfonamida (300µg)	≤ 12	13 a 16	≥ 17

O teste foi realizado em duplicata (os mesmos discos de antimicrobianos para duas placas de Petri tipo pizza contendo o mesmo micro-organismo isolado ativado) em duas repetições.

3.5. Teste de antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus* spp. frente às amostras de *Staphylococcus* spp.

Para a realização dos testes de antagonismo foram utilizadas três amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas da mesma origem de onde foram isoladas as amostras de *Staphylococcus* spp. e identificados ao nível molecular por PCR-ARDRA 16S-23S (Resende, 2010). Foram selecionadas uma amostra de *L. plantarum* e duas amostras de *L. rhamnosus*. As amostras de *Lactobacillus* spp. foram previamente cultivadas em caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) (*Difco, Kansas, EUA*), a 37°C por 24 horas, sob aerobiose. Após duas ativações, 5mL de cada cultivo de micro-organismo foram colocados sobre o centro da superfície de uma placa de Petri, contendo ágar MRS, que foi incubado sob aerobiose a 37°C durante 48 horas. Após esse período, as placas foram retiradas das câmaras de incubação com as manchas de crescimento no centro da placa. Foi colocado clorofórmio nas tampas dessas placas, deixando-o agir por 30 minutos e mais 30 minutos, posteriormente, sob luz

ultravioleta (luz UV). Com isso, os micro-organismos que cresceram nas manchas foram eliminados e foi possibilitada a avaliação da ação de supostas substâncias inibidoras produzidas pelas bactérias e liberadas no meio de cultura.

As 15 amostras de *Staphylococcus* spp. foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após duas ativações, 100µL de cada amostra desses micro-organismos foram transferidos para 3,5 mL de ágar semi-sólido (0,75% de ágar), que foi então vertido sobre as placas de ágar MRS logo após a ação do clorofórmio e da luz UV. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas, sob aerobiose. Posteriormente, a leitura dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital (*Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil*).

A metodologia deste teste foi inicialmente proposta por Tagg et al. (1976). No presente trabalho, o antagonismo foi realizado em triplicata e em três repetições. Os resultados foram submetidos às análises estatísticas descritivas e não paramétricas, sendo que a comparação entre as médias dos diferentes tratamentos realizados foi feita de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 2002).

3.6. Detecção de genes codificadores da produção de toxinas

A metodologia utilizada foi adaptada de Freitas et al. (2009). Foi realizada a extração do DNA e amplificação dos fragmentos de DNA, seguida de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

Para a pesquisa dos genes toxigênicos, realizou-se uma reação de PCR-Multiplex para os genes *sea*, *sec*, *sed* e *see* e duas reações de PCR-Uniplex individuais para a pesquisa dos genes *seb* e *tst*. Os *primers* para as reações de PCR foram sintetizados tendo como base as sequências publicadas por Becker et al. (1998) conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2. *Primers* utilizados para a detecção por PCR dos genes *sea-see* e *tst* em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)

Gene	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Sea</i>	SEA Fw SEA Rv	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	127
<i>Seb</i>	SEB Fw SEB Rv	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	477
<i>Sec</i>	SEC Fw SEC Rv	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	271
<i>Sed</i>	SED Fw SED Rv	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	319
<i>See</i>	SEE Fw SEE Rv	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	178
<i>Tst</i>	TST Fw TST Rv	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG ATCGAACTTTGGCCCATACCTTT	445

Legenda: Fw: forward – senso e Rv: reverse – reverso

A reação de PCR-Multiplex foi preparada para um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM de KCl, 160µM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 20ng de DNA genômico e

1,2U da *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*, São Paulo, Brasil). As amplificações foram realizadas no mesmo termociclador citado anteriormente, utilizando-se a seguinte programação:

Desnaturação	94°C	2 minutos
	95°C	1 minuto
Anelamento	55°C	1 minuto
Extensão	72°C	2 minutos
Extensão final	72°C	7 minutos
	4°C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão: 30

Para a pesquisa dos genes *seb* e *tst*, foram realizadas duas reações individuais de PCR-

Uniplex, separadamente. Essas reações foram realizadas para um volume final

também de 25µL contendo os mesmos componentes e nas mesmas proporções que o descrito anteriormente. As amplificações

dos fragmentos para os gene *seb* e *tst* foram realizadas de acordo com as seguintes programações, respectivamente:

Desnaturação	94°C	2 minutos
	95°C	1 minuto
Anelamento	60°C	1 minuto
Extensão	72°C	2 minutos
Extensão final	72°C	2 minutos
	4°C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão: 30

Desnaturação	94°C	5 minutos
	95°C	1 minuto
Anelamento	55°C	1 minuto
Extensão	72°C	2 minutos
Extensão final	72°C	7 minutos
	4°C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão: 30

Os produtos de amplificação das reações de PCR- Multiplex e PCR-Uniplex foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídeo (1,5%) por 60 minutos, visualizados e fotografados em equipamento de foto-documentação com luz ultravioleta.

Como controle positivo, foram utilizadas as amostras padrão de *Staphylococcus* spp. FRI MN8, para os genes *sea* e *tst*; FRI S6, para o gene *seb*; FRI 361, para os genes *sec* e *sed* e FRI 326, para o gene *see*, provenientes do

Instituto de Pesquisa em Alimentos (*Food Research Institute* – FRI - EUA) e gentilmente disponibilizadas pelo Dr. Luiz Simeão do Carmo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação das amostras

Os resultados das provas bioquímicas, bem como da identificação molecular, estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Perfil bioquímico e identificação molecular das amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)

Amostra	Identificação molecular	Gram	Cat.	Coa.	Term.	Man.
1	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
2	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
3	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	-	-	-
4	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	+	+	-	-	+
5	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	+	+	-	-	+
6	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	+	+	+	+	+

7	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
8	<i>Kocuria kristinae</i>	+	+	-	-	+
9	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
12	<i>S. warneri</i>	+	+	+	+	+
A	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
B	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	-	-	+
C	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
D	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+
E	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	-	-	+
F	<i>S. warneri</i>	+	+	-	-	+

Legenda: Cat.=Catalase; Coa=Coagulase; Term.=Termonuclease; Man.=Manitol

Das 16 amostras obtidas utilizando-se metodologia preconizada para isolamento de *Staphylococcus* spp., 15 foram identificadas por biologia molecular como pertencentes a esse gênero, sendo: nove *S. aureus* subsp. *aureus*, três *S. saprophyticus* subsp. *bovis* e dois *S. warneri*. A amostra restante foi identificada como *Kocuria kristinae*.

Kocuria é um gênero de bactérias da família Micrococcaceae que foi anteriormente classificada como *Micrococcus*. Após análises quimiotaxonômicas e filogenéticas, houve a necessidade de reclassificação desses micro-organismos para um novo gênero (Stackebrandt et al., 1995). Como grande parte dessa família, *Kocuria* está disseminada na natureza e é frequentemente encontrada como habitante da microbiota natural da pele de seres humanos e outros mamíferos. Infecções causadas por espécies desse gênero são pouco comuns; porém, já houve relato de caso de bacteremia por *Kocuria kristinae* relacionada ao uso de cateter em uma paciente com tumor de ovário (Basaglia et al., 2002) e do seu isolamento a partir da bile de um paciente com colecistite aguda (Ma et al., 2005). *Staphylococcus* também é habitante normal da pele de animais e humanos e também já esteve envolvido em quadros de colecistite conforme relatado por Merchant e Falsey (2002), o que sugere semelhança entre essas duas espécies.

A identificação errônea entre *Kocuria* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativo utilizando-se provas bioquímicas não é um fato incomum devido à variabilidade fenotípica. Ben-Ami et al. (2005) relataram a identificação errônea de 20 micro-organismos isolados clínicos de *Kocuria* spp., por método fenotípico, como *Staphylococcus* coagulase negativo. Os referidos autores atribuíram o erro à variação fenotípica, que pode ocorrer devido a alterações no meio de cultura ou nas condições de crescimento aos quais os micro-organismos são submetidos durante a realização dos testes. Além disso, os métodos genômicos, como o sequenciamento genético do gene RNA ribossomal 16S, são apontados por eles como padrão-ouro na identificação dessas espécies.

Em relação às amostras de *Staphylococcus* spp., o confronto dos resultados das provas bioquímicas com os obtidos pelo sequenciamento molecular mostrou que, apesar de vários autores preconizarem resultados positivos nas provas de coagulase, termonuclease e manitol para *S. aureus* (Quinn et al., 2005; Trabulsi e Toledo, 2005; Silva et al., 2010), três das dez amostras sequenciadas e identificadas como pertencentes a essa espécie mostraram resultado negativo aos testes de coagulase e

termonuclease, sendo que uma delas apresentou resultado negativo também ao teste de fermentação do manitol. A identificação de micro-organismos por técnicas moleculares é altamente específica. O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S, em particular, tem sido considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte e Caliendo, 2003). Em contrapartida, a identificação de bactérias a partir de combinações de análises bioquímicas pode originar resultados controversos e pouco confiáveis, pois a realização dessas provas pode sofrer influência de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, o que pode comprometer sua veracidade. Além disso, análises fenotípicas podem apresentar baixa sensibilidade, mascarando as características reais dos indivíduos estudados com resultados falso-negativos, tendo em vista que os genes que codificam determinada característica podem estar presentes, porém podem não estar sendo expressos no momento em que a análise é executada.

4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade das amostras de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos testados apresenta-se disposto na figura 1, enquanto que os perfis de resistência aos antimicrobianos testados por espécie apresentam-se dispostos nas figuras 2, 3 e 4.

De modo geral, as 15 amostras de *Staphylococcus* spp. apresentaram baixo percentual de resistência aos 20 antimicrobianos testados. As amostras analisadas apresentaram maior percentual de resistência à sulfonamida (100%). Alto percentual de resistência também foi observado à penicilina (80%), à ceftazidima (60%) e à oxacilina (40%). Em relação às demais drogas testadas, os percentuais de resistências encontrados foram abaixo de 30%. Ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina e amoxacilina revelaram 26,7% das amostras resistentes; cloranfenicol, sulfazotrim e nitrofurantoína foram ineficazes em apenas 13,3% das amostras; as demais drogas (vancomicina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, imipenema, cefoxitina, amicacina, ceftriaxona e cefaclor) mostraram-se eficientes em 100% das amostras testadas.

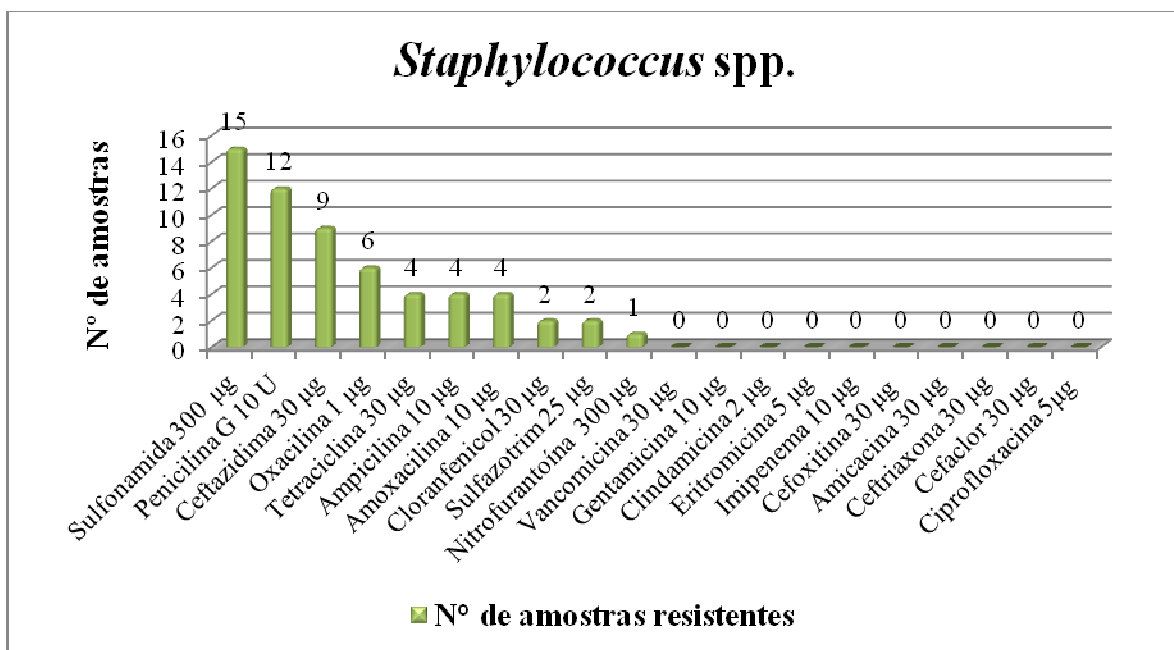


Figura 1. Perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra

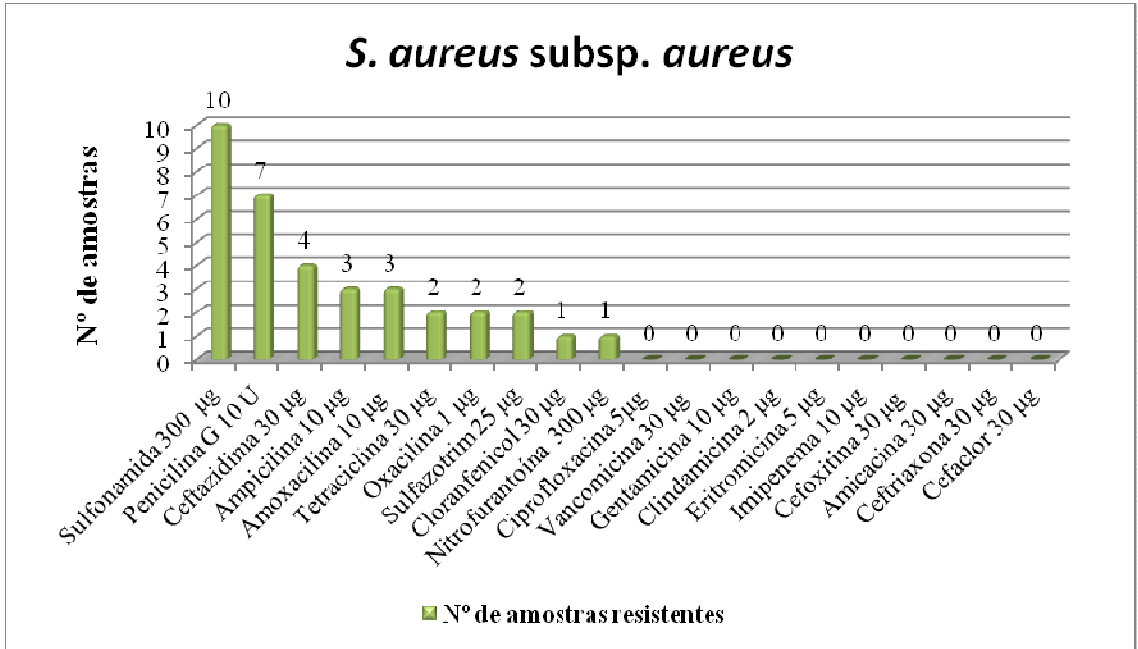


Figura 2. Perfil de resistência das amostras de *S. aureus* subsp. *aureus* isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra

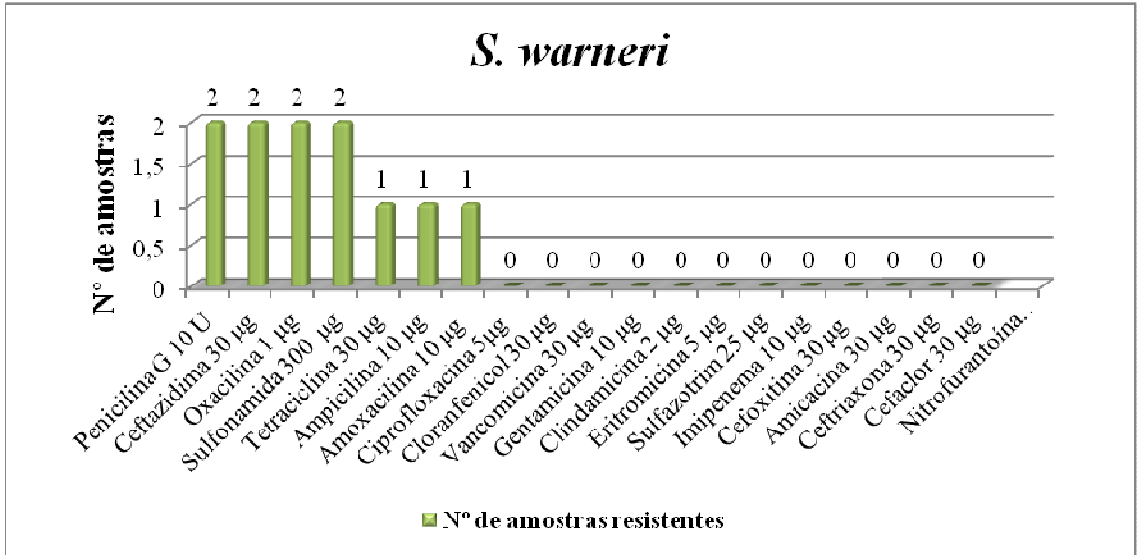


Figura 3. Perfil de resistência das amostras de *S. warneri* isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra

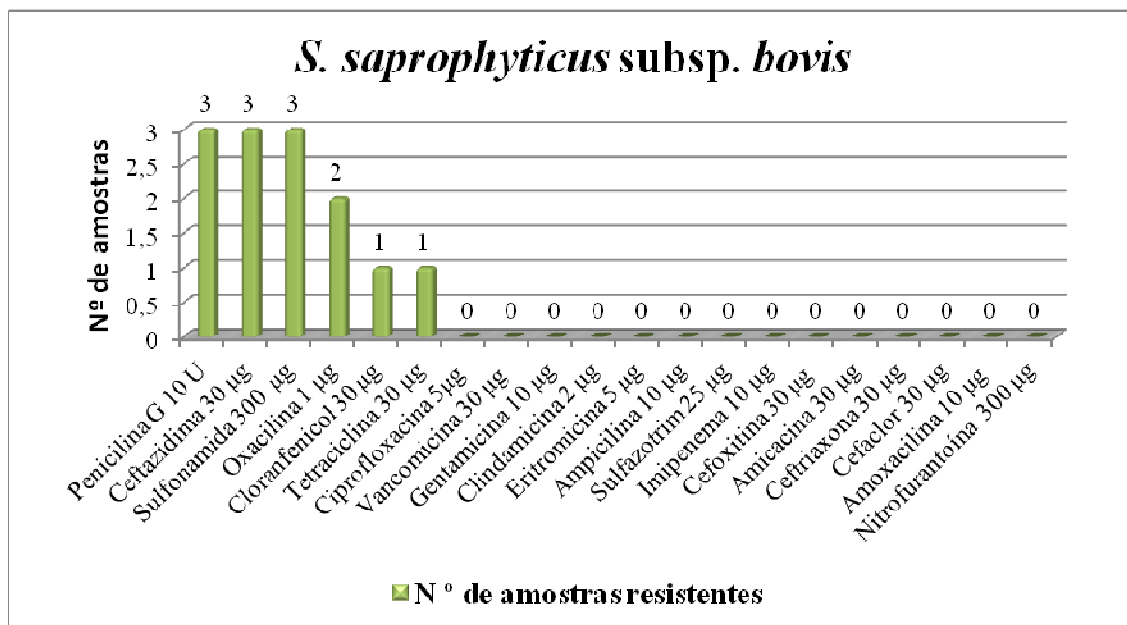


Figura 4. Perfil de resistência das amostras de *S. saprophyticus* subsp. *bovis* isoladas de queijos artesanais da região Serra da Canastra

Ausência de sensibilidade em todas as amostras foi encontrada para a sulfonamida. Essa droga possui efeito bacteriostático, inibindo o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo. A resistência de micro-organismos à sulfonamida pode ser determinada por mutação ou pela aquisição de plasmídeos. A associação desse fármaco com o trimetoprim leva a um efeito sinérgico, pois atuam em passos diferentes da síntese do ácido tetra-hidrofólico (folínico), necessária para a síntese dos ácidos nucleicos (ANVISA, 2007). Essa associação dificulta o mecanismo de resistência, como pode ser observado nos resultados do presente trabalho, em que as amostras testadas apresentaram baixo percentual de resistência ao sulfazotrim (13,3%), que é um exemplo dessa associação.

Em relação à susceptibilidade à penicilina, o resultado do presente trabalho está de acordo com Rapini et al. (2004), que ao analisarem 45 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo tipo coalho, verificaram 100% de resistência à penicilina. A causa dos altos

percentuais de resistência a essa droga apresentados por *Staphylococcus* spp. isolados de derivados lácteos pode ser atribuída à utilização empírica e indiscriminada desse princípio ativo no tratamento da mastite bovina causada por esses micro-organismos, de modo a proporcionar o aparecimento de linhagens resistentes. Resultado semelhante foi encontrado por André et al. (2008), que ao testarem 20 amostras de *S. aureus* provenientes de queijos de um laticínio em Goiás, observaram resistência em 60% delas a esse fármaco. Resch et al. (2008) avaliaram a susceptibilidade de 330 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de alimentos diversos e observaram também elevado percentual (55%) de resistência à penicilina. Do mesmo modo, Costa (2010a) observou elevada porcentagem de resistência à referida droga (53,7%) em 95 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo Minas frescal submetidas ao antibiograma.

De acordo com os resultados, pode-se perceber que grande parte das drogas

utilizadas do grupo das penicilinas também apresentou, de modo geral, elevados percentuais de resistência: oxacilina (40%), ampicilina e amoxicilina (26,7%). Somente à cefoxitina, que também pertence a esse grupo, não foi observada resistência em nenhuma das amostras testadas. Alto percentual de resistência também foi encontrado para a ceftazidima (60%) que, assim como as Penicilinas, são antimicrobianos β -Lactâmicos. Essas drogas têm comumente induzido *Staphylococcus* spp. a adquirirem resistência, seja pela capacidade de produzir a enzima β -lactamase ou pela produção de uma proteína diferenciada de parede, codificada pela região gênica chamada *mec*, que caracteriza os micro-organismos considerados resistentes à meticilina.

Atualmente, a oxacilina e a cefoxitina têm sido utilizadas para avaliar a resistência à meticilina (ANVISA, 2005). Os resultados encontrados para essas drogas foram bastante divergentes, sendo que 40% das amostras testadas apresentaram resistência à primeira e todas as amostras foram sensíveis à segunda. Resultados semelhantes foram

encontrados por Resch et al. (2008), em que foi observado nível de resistência à oxacilina (35%) muito superior ao encontrado para a cefoxitina (3%). Esses resultados não estão de acordo com Costa (2010), em que a porcentagem de resistência foi semelhante (em torno de 15%) para as duas drogas. Apesar de os resultados obtidos por meio do teste de difusão de discos contendo antimicrobianos, a detecção do gene *mecA*, que codifica a resistência à meticilina por meio de técnicas moleculares, como a PCR, é considerada padrão ouro para identificar esse tipo de micro-organismo (Miyazaki, 2006). Portanto, os resultados fenotípicos podem não estar de acordo com o genótipo do micro-organismo, o que pode contribuir para resultados falso-negativos.

4.3. Antagonismo entre *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Os resultados referentes ao teste de antagonismo *in vitro* de três amostras de *Lactobacillus* spp. frente às amostras de *Staphylococcus* spp. podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus* spp. frente às amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG)

Bactéria ácido-lática	Média (mm)	Desvio-padrão	CV (%)
<i>L. plantarum</i> (B19)	39,78 ^a	6,27	15,76
<i>L. rhamnosus</i> (D1)	37,57 ^{ab}	5,42	14,43
<i>L. rhamnosus</i> (B4)	34,96 ^b	7,25	20,74

Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)

Quanto ao antagonismo *in vitro*, as amostras de *Lactobacillus* spp. foram capazes de inibir todas as amostras de *Staphylococcus* spp. testadas. Tendo em vista que ambas foram isoladas dos mesmos queijos, sugere-se que essa mesma inibição poderia ocorrer também nesse produto, o que explicaria a

baixa ocorrência de surtos relacionados ao consumo de queijos artesanais.

Houve diferença ($P < 0,05$) entre as atividades antagonistas exercidas pelas bactérias ácido-láticas sobre as amostras de *Staphylococcus* spp.. A amostra de *L.*

plantarum apresentou média de inibição superior à média de uma das amostras de *L. rhamnosus*. A outra amostra de *L. rhamnosus* apresentou média intermediária e semelhante estatisticamente em relação às demais. Esse resultado mostra que pode haver divergências na capacidade de produção de substâncias inibitórias não só entre espécies diferentes, mas também dentro de uma mesma espécie.

Em concordância com o presente trabalho, o antagonismo de *Lactobacillus* e outras BAL frente a *S. aureus* foi avaliado e confirmado por Fang et al. (1996). Nesse trabalho, a atividade antagonista foi avaliada em meio de cultura e em leite, sendo que resultados mais expressivos foram encontrados no meio contendo leite. Resultados semelhantes foram encontrados por Vaughan et al. (1994) e Alexandre et al. (2002), que também demonstraram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo artesanal frente a *S. aureus* e a outros micro-organismos patogênicos.

O resultado do presente trabalho também está de acordo com Guedes Neto et al. (2005), que analisaram a atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isolados de queijo coalho de Pernambuco frente a diversos micro-organismos patogênicos, entre eles *Staphylococcus* spp., e observaram o poder de inibição exercido pelas BAL em todas as amostras patogênicas testadas. Além disso, *L. rhamnosus* foi a espécie que apresentou a maior média de halos de inibição frente a *Staphylococcus* spp.

Pribul et al. (2011) avaliaram o efeito de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. sobre amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vaca com mastite e observaram diferentes níveis de inibição, sendo que a bacteriocina produzida por *L. fermentum* foi a que apresentou os melhores resultados.

Seridan et al. (2012) avaliaram a viabilidade de *S. aureus* produtor de SEB em queijos experimentais elaborados com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* e observaram que, apesar de esses micro-organismos não terem sido capazes de antagonizar o crescimento de *S. aureus*, houve uma potencial inibição da produção da enterotoxina estafilocócica, o que aponta a contribuição desses micro-organismos ácido-láticos na melhoria da qualidade sanitária de queijos artesanais.

Os resultados apresentados mostram a importância das BAL, em especial do gênero *Lactobacillus*, como integrante da microbiota desejável de queijos artesanais e também como inibidor do crescimento de *Staphylococcus* spp. Além disso, mesmo que as substâncias produzidas pelas BAL não sejam suficientes para impedir o desenvolvimento por completo dessas bactérias consideradas patogênicas, poderia inibir a produção de enterotoxinas, o que, de certa forma, poderia contribuir para a segurança alimentar desse alimento tão consumido não só em Minas Gerais, mas em todo o Brasil.

4.4. Pesquisa de genes codificadores da produção de toxinas

Não foram encontrados genes codificadores da produção de toxinas estafilocócicas em nenhuma das amostras analisadas. Houve amplificação dos segmentos de tamanho esperado para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* somente nas amostras de referência (FRI) utilizadas como controle positivo, conforme mostrado nas Figuras 5, 6 e 7.

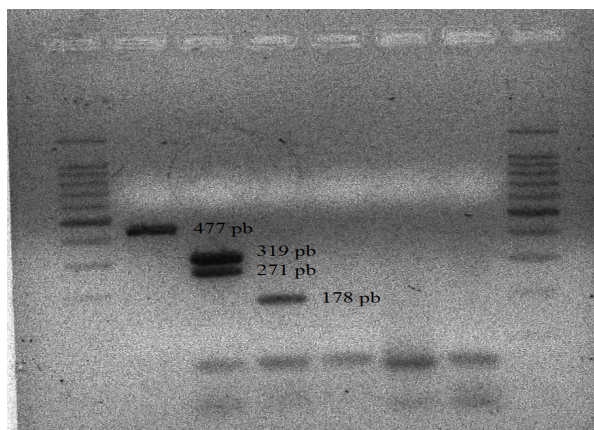


Figura 5: Produto de amplificação por PCR dos genes *seb* (linha 2), *sec* e *sed* (linha 3) e *see* (linha 4)

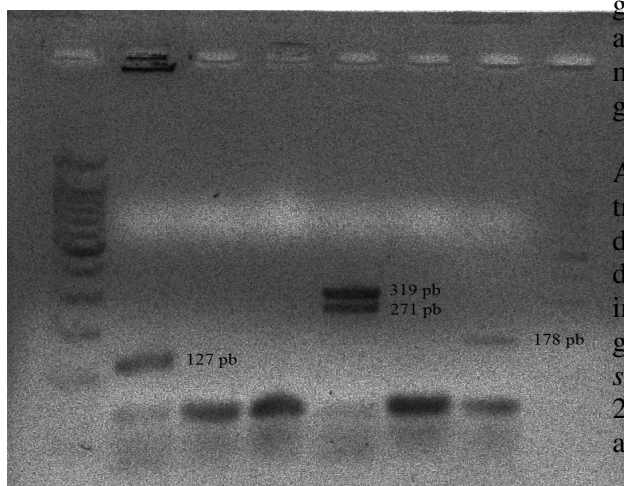


Figura 6: Produto de amplificação por PCR dos genes *sea* (linha 2), *sec* e *sed* (linha 5) e *see* (linha 7)

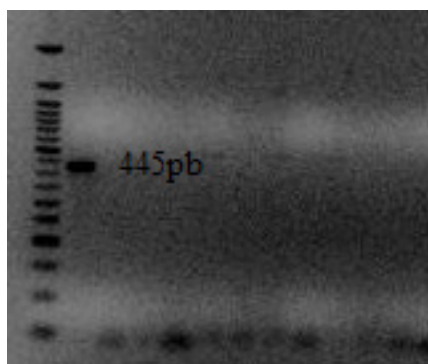


Figura 7: Produto de amplificação por PCR do gene *tst* (linha 2)

McLauchlin et al. (2000) encontraram resultados semelhantes ao analisarem 23 amostras de *Staphylococcus* spp. envolvidas em casos de intoxicação alimentar, pois não observaram a produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas detectaram a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estes podem ter sido os responsáveis pela produção das toxinas envolvidas nos surtos ocorridos.

Omoe et al. (2002) analisaram 143 amostras de *S. aureus* isoladas de diferentes fontes em relação à presença dos genes *sea* a *sei* e encontraram em 77,4% pelo menos um dos genes pesquisados. Entretanto, das 21 amostras isoladas de leite de vacas com mastite, não foram detectados nenhum dos genes codificadores *sea*, *seb*, *sed* e *see*.

Ao contrário do encontrado no presente trabalho, Veras (2004) analisou 30 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite e derivados envolvidos em surtos de intoxicação alimentar quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, e encontrou o gene *sea* em 26,6% das amostras, o gene *seb* em 20%, o gene *sec* em 3,3% e nenhuma amostra apresentou o gene *sed*.

Silva et al. (2005) encontraram baixa frequência de amostras de *S. aureus* enterotoxigênico em leite de vacas com mastite. Das 64 amostras isoladas, somente quatro (6%) apresentaram os genes *sea* e *seb* e apenas duas (3%) continham o gene *sec*.

Borges et al. (2008) pesquisaram os genes toxigênicos *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, *see*, *sei* e *sej* em 32 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho e constataram a presença dos genes *sea* e *sec* em 12 amostras (37,5%), inclusive amostras negativas no teste da coagulase, o que, mais uma vez, ratifica a ausência de relação entre o resultado positivo para o referido teste bioquímico e a capacidade de produção de toxinas.

Resultados semelhantes ao presente trabalho também foram encontrados por Luz (2008), em que nenhum dos 94 amostras de *S. aureus* provenientes de leite e queijo de coalho examinados pela PCR-Multiplex comportava os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst*. Em contrapartida, nesse mesmo trabalho, pelo menos um dos genes que codificam as enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ foi detectado em 93,6% das amostras. O referido autor atribuiu a ausência de genes para as toxinas clássicas e a presença dos genes para as demais toxinas descritas ao tempo e à distribuição geográfica dos isolados toxigênicos. Segundo ele, os perfis dos genes para as enterotoxinas estafilocócicas parecem ser variáveis entre diferentes anos e origens geográficas. Andrade (2009) também analisou 95 amostras provenientes de queijo de coalho quanto à presença de genes para *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *sel* e constatou a presença somente dos genes para SEG e SEH, mostrando, mais uma vez a ausência de genes codificadores da produção de enterotoxinas clássicas em queijos artesanais. Freitas et al. (2009) analisaram 20 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho e não encontraram genes toxigênicos para as enterotoxinas SEA, SEB e SEE, porém, encontraram em 90% das amostras pelo menos um dos genes *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *tst*, nas respectivas proporções: 11%, 9%, 20%, 16%, 25%, 14% e 5%.

Dias et al. (2011) analisaram 145 amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de tanques de refrigeração de fazendas da região de Sete Lagoas em relação à presença dos genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB e SEC e encontraram o gene *sea* em 60% das amostras, o gene *seb* em 37,9% e o gene *sec* em 6,9% das amostras analisadas.

Borelli et al. (2011) avaliaram a presença dos genes toxigênicos *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em

95 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos provenientes de três fazendas diferentes da região da Serra da Canastra (MG), em diferentes períodos de maturação, e não encontraram resultado positivo em nenhuma delas. De acordo com Santos (2010), a maturação é uma das formas de melhorar a qualidade microbiológica de um queijo, pois, mesmo havendo uma contagem inicial de patógenos elevada, esse processo favoreceria a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos considerados de fundamental importância para a estabilidade e a segurança alimentar do queijo. De acordo com Beresford et al. (2001), a diminuição da contagem bacteriana ao longo da maturação pode estar relacionada com a produção de ácidos orgânicos, assim como a perda de água e aumento da concentração de sólidos totais, como o cloreto de sódio, o que inibe o crescimento microbiano.

A intoxicação alimentar devido à ingestão de toxinas produzidas durante o desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. configura um sério problema de saúde pública. Por isso, cada vez mais as pesquisas estão envolvidas no aprofundamento do conhecimento desse micro-organismo e de seus fatores de virulência. Apesar de não detectados no presente trabalho genes codificadores da produção de enterotoxinas clássicas, podem estar presentes nessas amostras genes para as demais toxinas não pesquisadas. Antigamente, as toxinas clássicas eram consideradas as principais causas de surtos; porém, as toxinas consideradas não clássicas também têm sido cada vez mais envolvidas nesses casos, portanto não devem ser negligenciadas.

5. CONCLUSÕES

A identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. deve ser realizada preferencialmente por metodologia de sequenciamento do gene ribossomal RNA 16S, devido à sua maior especificidade, em detrimento de metodologias baseadas em

características fenotípicas, que apresentam maior susceptibilidade a erros.

As amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos artesanais da região da Serra da Canastra (MG) apresentam resistência principalmente às sulfonamidas e aos β -lactâmicos. Entretanto, apresentam elevada susceptibilidade às outras drogas comumente utilizadas em terapias antimicrobianas.

As amostras de *Staphylococcus* spp. são inibidas por micro-organismos do gênero *Lactobacillus*, principalmente *L. plantarum*, o que ratifica o caráter benéfico e desejável desse micro-organismo acidolático na microbiota de queijos artesanais e na sua contribuição para a segurança alimentar desse tipo de produto.

As amostras de *Staphylococcus* spp. não apresentam genes responsáveis pela codificação da produção das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), não sendo, portanto, capazes de desencadear surtos de intoxicação especificamente por essas toxinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-AMER, A. E. Molecular Characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 54, n 2, p. 107-119, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. *Diário Oficial*. Brasília.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Normas de desempenho para testes de sensibilidade*

antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo, v. 25, n. 1, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico*. RM controle, 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm Acesso em 24/04/2012.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro-organismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.424-428, 2002.

ANDRADE, M. A. *Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em Staphylococcus aureus isolados de amostras clínicas*. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

ANDRADE, A. P. C. *Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de Staphylococcus spp. isolados de queijo de coalho*. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ANDRADE, C. R. G. *Propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra – MG*. 2012. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel

electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control*, v. 19, n. 2, p. 200-207, 2008.

ARAÚJO, R. A. B. M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá*. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BAIRD PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, v. 69, n. 19, p. 1S – 8S, 1990.

BASAGLIA, G., CARRETTO, E., BARBARINI, D., et al. Catheter-related bacteremia due to *Kocuria kristinae* in a patient with ovarian cancer. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p.311-313, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BEN-AMI, R.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHARTZ, D. et al. Erroneous reporting of coagulase-negative Staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 System. *J. Clin. Microbiol.*, p. 1448–1450, 2005.

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 syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, p. 2548-2553, 1998.

BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., et al. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* v. 42, n.11, p. 4988-4995, 2004.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. et al. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, v.11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BERGDOLL, M. S.; CHESNEY, P. J. *Toxic chock syndrome*. Boston: CRC, 1991. 235p.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. Bergey's manual of determinative microbiology. 9th ed. Baltimore:Williams&Wilkins, 1994. 787 p.

BERKE, A.; TILTON, R. C. Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 23, p. 916–919, 1986.

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

BORELLI, B. M. *Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra - MG*. 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R. et al. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.2, p.481-487, 2011.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos

- láticos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *Bol. Centro Pesq. Process. Alimen.*, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.
- BRANT, L. M. F. *Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas artesanal do Serro – MG*. 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CÂMARA, S. A. V. *Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 – 2001*. 2002. 79 f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde) - Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Secretaria de Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *Int. Dairy J.*, v.13, p.191-200, 2003.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.
- CHIN, H.S.; SHIM, J.S.; KIM, J.M.; et al. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotechnol.*, v.10, n. 4, p.335-341, 2001.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.71, p.1-20, 2001.
- COSTA, H. H. S. *Potencial probiótico de Lactobacillus spp. e Weissella paramesenteroides isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010a.
- COSTA, J. C. B. *Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença dos genes mecA e qacA/B em Staphylococcus spp. isolados de queijo minas frescal*. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2010b.
- DIAS, N. L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D. C. B. S. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciênc. Rural*, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FANG, W.; SHI, M.; HUANG, L. et al. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and in milk. *Vet. Res.*, v. 27, n. 2, 1996.
- FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; BALBINO, T. C. L. et al. Exotoxinas Estafilocócicas. *Ciênc. Vet. Trop.*, v. 7, p. 63-74, 2004.
- FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 29, n. 2, p. 375-379, 2009.
- GANDRA, E. A. *Identificação de Staphylococcus aureus, S. Intermedius e S. Hyicus através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de seqüências dos*

- genes coa e nuc.* 2003. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005.
- JAURRAD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A. et al. Egc a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, v. 166, p. 669-677, 2001.
- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- KLOSS, W.E. Systematics and natural history of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, v. 69, n. 19, p. 25S – 37S, 1990.
- LACHICA, R. V. F.; WEISS, K. F.; DEIBEL, R. H. et al. Relationships among coagulase, enterotoxin and heat stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, v. 18, n. 2, p. 126-127, 1969.
- LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.
- LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 38-43, 2003.
- LUZ, I. S. *Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco*. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- MA, E. S. K.; WONG, C. L. P.; LAI, K. T. W. et al. *Kocuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. *BMC Infect. Dis.*, v. 5, p. 60, 2005.
- MAC FADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980, 301p.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F., FONSECA, L. M. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, vol. 24, n. , p. 516-521, 2004.
- McLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, v. 63, p.479-488, 2000
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Biology of microorganisms*. 8. ed. London: Prentice Hall International, 1997.
- MENEZES, L.D.M.; PENA, E.C.; SOUZA, V.F. et al. Avaliação microbiológica do

queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. CD ROM.

MERCHANT, S. S.; FALSEY, A. R. *Staphylococcus aureus* cholecystitis: a report of three cases with review of the literature. *Yale J. Biol. Med.*, v. 75, p. 285-291, 2002.

MIYAZAKI, N. H. T. *Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em Staphylococcus aureus resistentes à metilina*. 2006. 92f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MULLER, F. M. P. *Susceptibilidade a antimicrobianos de Staphylococcus aureus recuperados de leite bovino in natura e envolvidos em surto de intoxicação alimentar*. 2003. 98f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J. et al. Identification and characterization of *Staphylococcus enterotoxin* type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 3337-3348, 1998.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. et al. *Microbiologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 604 p.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 38, p.13-126, 1999.

NÓBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F.; DORES, M.T. et al. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais. *Rev. Inst. Latc. "Cândido Tostes"*, v. 63, n. 363, p. 26-30, 2008.

NOLTE, F. S.; CALIENDO, A. M. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H., et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press, 2003. p.234-256.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.

ORNELAS, E. A. *Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra*. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 52, p. 641- 658.

PEREIRA, M.L., LARA, M.A.; DIAS, R.S. et al. Staphylococcal food poisoning by cheese 'tipo Minas'. *Ver. de Microbiol.*, São Paulo, v. 22, p. 349-350, 1991.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. et al. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.*, v.59, n. 5, p. 559-561, 1996.

- PEREIRA, K. C.; SÁ, O. R.; PEREIRA, K. C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo Canastra e de sua matéria-prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). *Scientiae et Praxis*, v. 1, n. 2, p. 21-26, 2008.
- PRIBUL, B. R.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C. et al. Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.744-748, 2011.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.
- RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p.130-133, 2004.
- RESCH, M.; NAGEL, V.; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 127, p. 99-104, 2008.
- RESENDE, M. F. S. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. 72 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. et al. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: Influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas populações de bactérias ácido-láticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 117-137, 2003.
- RODRIGUEZ, L.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J. et al. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 6, p. 1897-1902, June, 1996.
- ROSS, R. P.; MORGAN, S; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 79, p. 3-16, 2002.
- SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev. de Saúde Públ.*, v. 22, 458-61, 1988.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON ALEGRO, L. C. et al. Artigo de revisão: Estafilococos em alimento. *Arq. do Inst. Biol.*, v.77, n.3, p.545-554, 2010.
- SANTOS, A. S. *Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro-MG: Efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação*. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar. *Manual das doenças transmitidas por alimentos e água*. São Paulo. 2003.
- SENA, M. J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes*

- nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE*. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) -Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R. et al. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p.465-470, 2012.
- SHIMITZ, F.J.; MACKENZIE, C.R.; HOFMANN, B. et al. Development of multiplex-PCR for direct detection of the gens enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus* isolates. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, p. 335-340, 1998.
- SILVA, E. R.; BOECHAT, J. U. D; MARTINS, J. C. D. et al. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Rumin. Res.*, v. 56, p. 271-275, 2005.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. et al. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2010. 295p.
- STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O. et al. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 45, p. 682-692, 1995.
- TAGG, J.R.; DAJAMI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 697 p.
- URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. *Int. J. Dairy Technol.*, v.54, p.146-150, 2001.
- VAUGHAN, E. E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.*, v.76, p.118-123, 1994.
- VALLE, J. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 1323-1326, 1990.
- VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. In: *I Congresso latino-americano de higienistas de alimentos; VII Congresso brasileiro de higienistas de alimentos*, 2003, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Associações de classe, 2003.
- VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados*. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 12, p. 410-415, 2008.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, v.14, p.321-325, 2000.

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

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 2000, v. 7, n.1-2, p. 203-214, 2000.

ANEXO

Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA com as sequências depositadas *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST.

AMOSTRA 1 – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

ACCGGAGCTAATAACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGG
TCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGC
TTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACCT
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAA
CTCTGTTATTAGGGAAGTACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCT
AATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGA
CAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGTCATG
TATTAGGCACGCCGCC

AMOSTRA 2 – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

AAACCGGAGCTAATAACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGAC
GGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC
GGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTA
AACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGT
ACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG

REVERSE

TTTCGCCCATTTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
CTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGT
AAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGC
AAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCTCC
GGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGT
CCGCCGCTAACATCAGAGTAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGTCATGTATT
AGGCACGCCGCC

AMOSTRA 3 – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

GGAAACCGGAGCTAATAACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAG
ACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC

GTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAAGTAACTGTGCACATCTTGAC
GGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG

REVERSE

TTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
CTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGT
AAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGC
AAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCTCC
GGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGT
CCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATT
AGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGC

AMOSTRA 4 – *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*

FORWARD

GAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAG
ATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTC
GTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAAGTAACTGTGCACGTCTTGAC
GGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTCGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCTATAAGTGA
TAGCAAAACCATCTTTCACTTTAGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTGCTCGACTTGCATG
TATTAGGCACGCCGCC

AMOSTRA 5 – *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*

FORWARD

AAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGAT
GGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC
GGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTA
AAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGT
ACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA

REVERSE

TTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
CTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTCGCCTTGGT
AAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCTATAAGTGATAGC
AAAACCATCTTTCACTTTAGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCTCC
GGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTGCTCGACTTGCAT
GTATTAGGCACGCCGCC

AMOSTRA 6 – *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*

FORWARD

AAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTT
GGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGG
TTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAA

REVERSE

TTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTCGCCTTGGTAAGCC
GTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAAC
CATCTTTCACTTTAGAACCATGCGGTTCCAAATGTTATCCGGTATTAGCTCCGGTTT
CCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCC
GCTAACGTCAAAGGAGC

AMOSTRA 7 - *Staphylococcus aureus*

FORWARD

TGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAG
CTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCT
GTCATTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACC
AAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTG
TTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC

REVERSE

TTTCGCCCATTCGCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
CTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGT
AAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGC
AAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCTCC
GGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGT
CCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGCATGTATT
AGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCA

AMOSTRA 8 – *Kocuria kristinae*

FORWARD

AAACTGGGTCTAATACCGGATGCGACTACTGCCCGCATGGGCTGGTGGTGGAAAGG
GTTATGTACTGGTCTTAGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTGGTTGGTGGGGTAATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGA
AACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGGTAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCG
GCTAACTACGTGCCAGCA

REVERSE

TATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC
CGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCA
ACCAGCTGATAGGCCGTGAGCCATCTAAGACCAGTACATAACCCTTTCCACCACC
AGCCCATGCGGGCAGTAGTCGCATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCCAGGCTTATCC
CAGAGTCAAAGGCAGGTCACCTACGTATTACTACCCGTTCCGCACTCATCCACCC
GGTGCAAGCACCAGGCTTCAGCGTTCGACTTGTCATGTGTAAAGCACGCCGCCAGCG
TTCGTCCTGAGC

AMOSTRA 9 – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

GAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA
CGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCG
TAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACG
GTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGA
CAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGATG
TATTAGGCACGCCGCC

AMOSTRA 12 – *Staphylococcus warneri*

FORWARD

TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCGTAAAAGTCTGTTATTAGGGAAGAAC
ATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAG

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGATCCATCTATAAGTGA
CAGCAAAACCGCCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGC

AMOSTRA A – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAG
ACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATC
GTAAAAGTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGAC
GGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG

REVERSE

GGCTTTTCGCCCATTTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG
TGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTT
GGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGAC
AGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGC
TCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC

CGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGC

AMOSTRA B – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAG
ACGGTCTTGCTGTCACCTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATC
GTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGAC
GGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGA
CAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGCATG

AMOSTRA C – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

GAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA
CGGTCTTGCTGTCACCTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCG
TAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACG
GTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG

REVERSE

AGGCTTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCT
TGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGA
CAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAG
CTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTCGCTCGACTTGCATG
TATTAGGCACGCCG

AMOSTRA D - *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*

FORWARD

TGCTGTCACCTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAACGGCTT
ACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGC
GAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCGTAAAC
TCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTAC

REVERSE

ATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAACGGCTTACCAAGGCAACGAT
GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA

CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTG

AMOSTRA E – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

FORWARD

TTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT
TACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAC
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAA
CTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCT

REVERSE

CAGGCTTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC
CGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTTCGGCTATGCATCGTTGCC
TTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTG
ACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTA
GCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCAT
GTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAG

AMOSTRA F – *Staphylococcus warneri*

FORWARD

GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAA
GGCGGCTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGT
AACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC
GTAAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGAC
GGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC

REVERSE

CAGGCTTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC
CGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTTCGGCTACGTATCGTTGCC
TTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGATCCATCTATAAGTG
ACAGCAAAGCCGCTTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAATATGTTATCCGGTATTA
GCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTGCTCGACTTGCAT
GTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGC