

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

TIPIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MANIPULADORES, LEITE CRU E QUEIJO MINAS FRESCAL

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fabiana Cristina Pimenta

**Tese submetida ao PPGMT/UFG como
requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Medicina Tropical, área
de concentração: Microbiologia.**

Goiânia-Go

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu tio Chico (Francisco Porfirio Neto). Exemplo de alguém que valorizava o saber, a inteligência e sobretudo, a vida. Que me incentivou desde o início e não pôde esperar o resultado. A quem não posso dar nada mais do que meu reconhecimento e gratidão. Com carinho e muitas saudades...

"Os ignorantes que acham que sabem tudo, privam-se de um dos maiores prazeres da vida: APRENDER. "

Provérbio popular

AGRADECIMENTOS

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."

Antoine de Saint-Exupery

Ao meu orientador e amigo Álvaro Bisol Serafini, pelo incentivo, paciência, tolerância, amizade, carinho, insistência... por tudo.

À minha co-orientadora Fabiana Cristina Pimenta, pelo estímulo, amizade, ajuda e principalmente por me apresentar outras possibilidades.

À minha amiga, colega, companheira, irmã, Maria Raquel Hidalgo Campos, pela solidariedade em todos os momentos, profissionais e pessoais. Por tornar meu caminho mais fácil e agradável.

Ao meu colega André Kipnis, pela cooperação, desprendimento, paciência e espírito científico em momentos críticos.

Às amigas Liana Jayme Borges, Carla Atavila dos Santos e Patrícia Pimentel dos Santos, pela colaboração na coleta das amostras, análises microbiológicas e tudo mais.

Ao proprietário e funcionários do laticínio que forneceram as amostras, sem os quais, não seria possível a realização deste trabalho.

Às colegas de pós-graduação, Juliana Lamaro, Lara Leão, Luciana Silva, Daniela Vilela, Lúcia Kioko, Megmar Carneiro pela amizade e companheirismo.

À minha grande amiga e espelho Márcia Alves Vasconcelos Rodrigues, pelo incentivo, apoio, conselhos e amizade.

Ao professor David Adams, pela ajuda na correção do trabalho na língua inglesa.

À professora Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade, pela oportunidade de usar o aparelho de PFGE e disponibilização do software para análise dos resultados.

Aos amigos Fernando Koslowski, José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares, pelo profissionalismo, competência e acessibilidade.

Aos funcionários dos laboratórios Vera Lúcia Penha, Aristides José Barbosa, Leda Maria e Ágabo Macedo da Costa e Silva pela ajuda e disponibilidade na execução do trabalho prático.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa André Kipnis, Luiz Arthur Mendes Bataus e Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito, Celso José de Moura e Eduardo César Tondo pelas valiosas contribuições na finalização da tese.

Aos professores Roberto Rhuman Daher, Divina das Dores de Paula Cardoso, Regina Maria Bringel Martins, pela cooperação e compreensão das nossas dificuldades durante o período que dirigiram a pós-graduação no IPTSP.

Ao Professor Ricardo Titze da UNB, pelo acolhimento e ajuda na realização da parte prática do trabalho.

Aos professores do curso, colegas de trabalho, funcionários e amigos que de alguma forma colaboraram para a realização do trabalho.

Aos meus familiares e amigos... pela convivência, apoio e incentivo.

Aos meus pais Cezar Porfirio Borges e Nilza Dantas Porfirio Borges que me fizeram como sou e me deram todas as oportunidades de crescer como profissional e como pessoa. Obrigada por tudo.

Ao meu marido, Eduardo Leão André pela paciência, tolerância, amizade, solidariedade, companheirismo, compreensão, doação e principalmente, amor.

Aos meus filhos, Fábio André Neto, Bruno Porfírio André e Giulia Porfírio André, pela certeza de um porto seguro, pela porta sempre aberta, pela renovação diária, por me fazerem sentir as melhores emoções da vida. Enfim... por existirem.

À Deus que possibilitou tudo isso.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

ATCC – The American Type Culture Collection

BEC – Clone Endêmico Brasileiro

BHI – Brain Heart Infusion

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CIP – Ciprofloxacina

CRP – Coagulase Restriction Profile

DOAs – Doenças de Origem Alimentar

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura

ERI – Eritromicina

ETA – Toxina Esfoliativa tipo A

ETB – Toxina Esfoliativa tipo B

GEN – Gentamicina

kb – kilobases

MDR – Multi-Droga Resistente

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

MRSA – *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

:g - Micrograma

MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST – Multilocus Sequence Typing

NCTC – National Collection of Type Culture

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEN – Penicilina

PFGE – Pulsed-field Gel Electrophoresis

PK – Proteinase K

PT – Pulsotype

PTSAGs – Toxinas Superantígenos Antigênicas

REA – Análise por Enzimas de Restrição

REB – Restriction Enzyme Buffer

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SE – Enterotoxinas Estafilocócicas

ST - Subtype

TET – Tetraciclina

TSST – 1 – Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

U – Unidades

UI – Unidades Internacionais

UFC/CFU – Unidade Formadora de Colônia/Colony Forming Unit

UPGMA – Unweighted-Pair Group Method Using Arithmetic Averages

VAN – Vancomicina

VP – Voges Proskauer

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	15
2.2 <i>Staphylococcus</i>	15
2.3 ENTEROTOXINAS	18
2.4 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA	20
2.5 MANIPULADOR	21
2.6 CONTAMINAÇÃO DE ORIGEM ANIMAL – MASTITES	23
2.7 LEITE BOVINO	25
2.8 QUEIJO MINAS FRESCAL	27
2.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Staphylococcus</i>	29
2.10 TIPIFICAÇÃO MICROBIANA	31
2.10.1 Técnicas de tipificação microbiana	33
2.10.1.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos – Antibiograma	36
2.10.1.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (PFGE)	41
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Artigo 1	67
Artigo 2	79
Normas para publicação do artigo 2	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
ANEXO 1	106
ANEXO 2	108
ANEXO 3	110
ANEXO 4	114

RESUMO

Este estudo teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar fenotípica e genotipicamente utilizando o antibiograma e RFLP seguido de eletroforese em gel em campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) respectivamente, isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal de um laticínio no estado de Goiás, visando estabelecer a possível fonte da bactéria para o produto final. Foram coletadas, pelo período de um ano (março/2004 a fevereiro/2005), 140 amostras, sendo 46 das mãos e 46 do nariz dos manipuladores, 24 de leite cru e 24 de queijo Minas Frescal. Os *S. aureus* foram obtidos de 75% dos manipuladores, resultando em 31 (33,7%) isolados, de 18 (75,0%) amostras de leite cru, resultando em 26 isolados, com média de contagem de $1,1 \times 10^5$ UFC/ml e ainda de 17 (70,8%) amostras de queijo, originando 20 isolados, com média de contagem de $3,8 \times 10^4$ UFC/g, sendo 13 (54,2%) com contagens acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (10^3 UFC/g). De acordo com o antibiograma, todos os isolados foram susceptíveis à ciprofloxacina e gentamicina. Foi observada resistência em 53 isolados (68,8%) para penicilina, 19 isolados (24,7%) para tetraciclina, cinco (6,5%) isolados para eritromicina, quatro isolados (5,2%) para oxacilina e um isolado (1,3%) para vancomicina. Onze (14,3%) isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados e 18 (23,4%) foram resistentes a mais de um antibiótico. O antibiograma permitiu a classificação das cepas em doze perfis diferentes (A-L), porém a técnica não foi eficiente em determinar a origem da contaminação do queijo. Dos 73 isolados, dois (um de leite e um de queijo) não foram tipificados pela análise molecular. A tipificação genotípica por PFGE originou 47 perfis eletroforéticos diferentes, obtidos das 71 cepas analisadas, mostrando grande diversidade genética entre eles e ausência de cepas endêmicas. Baseado nos resultados, quatro dos 20 *S. aureus* isolados do queijo foram idênticos ou altamente correlacionados com 10 cepas isoladas do leite cru e com duas cepas isoladas das mãos dos manipuladores. Nenhuma cepa isolada do nariz dos manipuladores apresentou correlação com aquelas isoladas do queijo ou do leite cru. A análise dos resultados sugere o leite cru como a fonte mais provável da bactéria para o queijo, na indústria analisada.

ABSTRACT

This study had as objectives, isolate, identify and characterize phenotypic and genotypically, using antibiogram and RFLP followed by pulsed-field gel electrophoresis, *Staphylococcus aureus* collected from food handlers, raw milk and Minas Frescal cheese, in order to investigate the probable source of bacteria for the final product. One hundred and forty samples were collected during the period of march/2004 to february/2005, being 46 from hands and 46 from anterior nares of food handlers, 24 from raw milk and 24 from Minas Frescal cheese in a dairy plant in Goiás, Brazil. *S. aureus* was isolated from 75% of personnel, resulting in 31 (33.7%) isolates, from 18 (75.0%) samples of raw milk, resulting in 26 isolates, with mean counts of 1.1×10^5 CFU/ml, and from 17 (70.8%) samples of cheeses, resulting in 20 isolates, with mean counts of 3.8×10^4 CFU/g, being 13 (54.2%) with counts above the limits established by brazilian legislation (10^3 CFU/g). According to antibiogram, all isolates were susceptible to ciprofloxacin e gentamicin. Resistance was observed in 53 (68.8%) isolates for penicillin, 19 (24.7%) isolates for tetracycline, five (6.5%) isolates for erythromycin, four (5.2%) isolates for oxacillin and one (1.3%) isolate for vancomycin. Eleven (14.3%) isolates were susceptible to all antibiotics tested and 18 (23.4%) showed resistance to more than one antibiotic. The antibiogram allowed us to classify the strains in 12 different phenotypes (A-L), but it was not efficient for the determination of the bacterial source for the cheeses. From the 73 isolates, two (one from milk and one from cheese) were not typeable by molecular analysis. The genotypic typing by PFGE generated 47 different DNA banding profiles from the 71 strains analyzed, showing high genetic diversity among the strains and a lack of predominance of an endemic clone in the industry. Based on the results, no strain isolated from nose was related to cheeses or raw milk. Four of 20 *S. aureus* isolated from cheeses were identical or closely related to 10 strains isolated from raw milk, and to two strains isolated from food handlers' hands, suggesting the raw milk as the most probable source of *S. aureus* contamination in cheeses.

1 INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar (DOA) são infecções ou intoxicações causadas pelo consumo de alimentos ou água. Nos países onde existem programas de vigilância epidemiológica de surtos de doenças transmitidas pelo consumo de alimentos, as bactérias são os agentes etiológicos envolvidos em mais de dois terços dos surtos (Silva Jr. 2005, Le Loir et al. 2003).

As bactérias, agentes de infecções de origem alimentar, têm sua patogênese determinada pela habilidade em colonizar, sobreviver e multiplicar nos tecidos dos hospedeiros enquanto que as bactérias agentes de intoxicação alimentar, têm sua patogênese dependente da capacidade de produzir toxinas antes ou depois do consumo do alimento (Le Loir et al. 2003).

Entre as bactérias agentes de intoxicação alimentar, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, produtor da enterotoxina estafilocócica. Esta bactéria permanece como uma das principais causas de intoxicação alimentar porque pode contaminar os alimentos durante sua preparação e processamento, principalmente alimentos que requerem manipulação como o queijo (Silva Jr. 2005, Le Loir et al. 2003).

As principais fontes de *Staphylococcus* para os alimentos são os manipuladores, que podem albergar a bactéria principalmente na nasofaringe e pele, e o animal ou seus produtos, como leite, carne, devido à presença do agente nestas fontes ou ainda às infecções causadas pelo mesmo, como as mastites, por exemplo (Franco & Landgraf 1996).

A aplicação de técnicas de tipificação microbiana, entre outras finalidades, visa caracterizar cepas dos microrganismos, evidenciando diferenças dentro da mesma espécie.

Para isto, utilizam-se técnicas fenotípicas, baseadas na expressão das características dos microrganismos e técnicas genotípicas, baseadas na análise do DNA destes microrganismos (Arbeit 1999). Estas técnicas são importantes ferramentas na investigação epidemiológica de surtos de toxinfecção alimentar, permitindo a investigação da fonte da contaminação para os alimentos e a adoção de medidas direcionadas aos problemas identificados, com o objetivo de controle sanitário dos alimentos, propiciando maior segurança ao consumidor (van Belkum et al. 2001).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

Doenças de origem alimentar (DOA) são definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “doenças de natureza infecciosa ou tóxica, causadas pelo consumo de alimentos e água”. Quando ocorrem dois ou mais casos de uma doença semelhante, resultante da ingestão de um alimento ou água em comum, está-se frente a um surto de DOA (Le Loir et al. 2003). Estas DOA, ocorrendo ou não sob a forma de surtos, têm sido registradas por organizações nacionais de saúde em vários países. Mais de 250 tipos diferentes destas doenças já foram descritas (Le Loir et al. 2003).

As bactérias são os agentes etiológicos implicados em dois terços dos surtos e estão freqüentemente associadas com alimentos de origem animal (Pan et al. 1997, Le Loir et al. 2003, Rooney et al. 2004). O *Staphylococcus aureus* é uma das causas mais freqüentes de gastroenterite, como consequência da ingestão de uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos contaminados (Jablonski & Bohach 1997, Pan et al. 1997, Le Loir et al. 2003). Eventualmente, outras espécies do gênero também podem produzir enterotoxinas, como o *S. intermedius* (Khambaty et al. 1994, Becker et al. 2001).

2.2 *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído de bactérias em forma de cocos, Gram positivas, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , que ocorrem isolados, aos pares, em tétrades,

pequenas cadeias ou sob a forma de “cachos de uva”. São microrganismos imóveis, não esporulados, produtores de catalase, não capsulados ou possuindo limitada capacidade de formação de cápsula. A maioria das espécies é anaeróbia facultativa e seu genoma tem aproximadamente 2.000 a 3.000 kb (Kloos & Bannerman 1999).

Estão amplamente distribuídos na natureza e apesar de serem encontrados predominantemente na pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves, também podem ser encontrados em outros sítios como na boca, sangue, glândulas mamárias e trato intestinal, genito-urinário e respiratório destes indivíduos (Kloos & Bannerman 1999, Vanderlinde et al. 1999).

Freqüentemente, os *Staphylococcus* estabelecem relações simbióticas com seus hospedeiros, porém, se as barreiras cutâneas e mucosas forem rompidas, estas bactérias podem se comportar como patogênicas (Kloos & Bannerman 1999). Apesar de muitas espécies serem consideradas saprófitas em várias regiões do corpo, o *S. aureus* é um dos principais patógenos da espécie humana (Jablonski & Bohach 1997).

O gênero *Staphylococcus* é composto de 40 espécies e 24 subespécies (Euzéby 1997). Certas espécies como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdenensis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* são agentes de diferentes infecções humanas e animais (Kloos & Bannerman 1999).

O principal reservatório de *Staphylococcus* envolvidos na doença humana é o próprio homem. *S. aureus* é a espécie mais importante do gênero, sendo causa significativa de infecção nosocomial tanto quanto de doenças adquiridas na comunidade. O espectro das infecções estafilocócicas varia desde pústulas e furúnculos até a síndrome do choque tóxico e sepse (Vanderlinde et al. 1999, Le Loir et al. 2003).

Esta bactéria é um importante patógeno devido à combinação de alguns fatores de virulência mediados por toxinas, invasividade e resistência a antibióticos. A ocorrência

das diversas infecções estafilocócicas depende de numerosos fatores de virulência apesar de que algumas doenças como a intoxicação alimentar estafilocócica ocorre em decorrência de um único fator de virulência, a produção de enterotoxinas (Le Loir et al. 2003).

O *S. aureus* produz várias exoproteínas e outros fatores de virulência que contribuem para sua habilidade em colonizar e causar doenças em mamíferos. A grande maioria das cepas secreta enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e collagenase. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas como a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas, as toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e a leucocidina (Balaban & Rasooly 2000, Dinges et al. 2000, Nagase et al. 2002, Zschöck et al. 2005).

Indivíduos podem portar a bactéria assintomaticamente em sítios como narinas, pele e períneo, e a disseminação entre pessoas ou para alimentos pode ocorrer por contato direto ou indireto (Jablonski & Bohach 1997). Admite-se que cerca de 20% a 50% da população humana seja portadora da bactéria (Jones et al. 2002, Le Loir et al. 2003).

O *S. aureus* multiplica-se dentro de uma ampla faixa de temperatura (7°C a 48,5°C, sendo a faixa de 30°C a 37°C, ótima para multiplicação), pH (4,2 a 9,3, sendo ótima a faixa de 7,0 a 7,5) e alta concentração de cloreto de sódio (15% de NaCl), o que favorece sua multiplicação numa grande variedade de alimentos. Este fato associado ao seu nicho ecológico, pode facilmente explicar sua ocorrência em alimentos que requerem manipulação durante o seu processamento, incluindo produtos como os queijos (Le Loir et al. 2003).

2.3 ENTEROTOXINAS

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs), agentes de intoxicação alimentar, são proteínas e podem estar envolvidas em diversos tipos de infecções no homem e animais (Akineden et al. 2001, Zschöck et al. 2005). Até o momento já foram identificados pelo menos 18 diferentes tipos sorológicos de SE, designadas SEA a SEE, SEG a SER e SEU (Balaban & Rasooly 2000, Dinges et al. 2000, Alouf & Muller-Alouf 2003, Letertre et al. 2003, Mempel et al. 2003, Martín et al. 2004, Loncarevic et al. 2005, Zschöck et al. 2005). Como algumas não demonstram atividade emética ou não foram testadas ainda para esta atividade, são mais apropriadamente denominadas de proteínas tipo enterotoxinas estafilocócicas (Lina et al. 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de cadeias curtas (em média 250 aminoácidos, peso molecular de 26.900 a 29.600) secretadas no meio e solúveis em água e soluções salinas (Su & Wong 1997, Le Loir et al. 2003). São ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, e resíduos de tirosina. A maioria delas possui um “*loop*” de cistina necessário à apropriada conformação da molécula e que provavelmente está envolvido na atividade emética. São altamente estáveis, resistindo à inativação pelas proteases gastrintestinais como pepsina e tripsina, assim como ao calor. Também resistem à quimotripsina, renina e papaína (Le Loir et al. 2003). A estabilidade ao calor parece ser dependente do meio onde a toxina se encontra, do pH, concentração de sal e outros fatores ambientais (Balaban & Rasooly 2000). Além disso, a inativação térmica é espontaneamente reversível em pH alcalino ou tratamento com uréia. Os dados apontam que as enterotoxinas resistem a condições que facilmente destroem as bactérias que as produzem. Podem estar presentes em alimentos, mesmo na ausência da bactéria (Jablonsky & Bohach 1997, Le Loir et al. 2003).

Todas estas toxinas exibem atividade super antigênica por interação direta, de maneira inespecífica, com células T receptoras de antígenos e com o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II das células apresentadoras de antígenos (APC). Esta interação resulta na ativação inespecífica e proliferação de linfócitos T e massiva secreção de interleucinas, que podem estar envolvidas no mecanismo de toxicidade das enterotoxinas (Balaban & Rasooly 2000, Dinges et al. 2000, Le Loir et al. 2003, Lina et al. 2004). TSST-1 e as SE são também conhecidas como toxinas superantígenos pirogênicos (PTSAg). Como a maioria das proteínas secretadas por *S. aureus*, estas são produzidas na fase pós-exponencial de crescimento bacteriano (Dinges et al. 2000).

Os genes para as enterotoxinas são carregados por plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos heterólogos, chamados de ilhas de patogenicidade. O alvo das enterotoxinas responsáveis pelo início do reflexo do vômito está localizado nas vísceras abdominais, onde os receptores para as mesmas estão presentes. Sabe-se que a resposta emética às enterotoxinas é dependente da ativação do centro medular do vômito no cérebro, que é estimulado por impulsos transmitidos pelo nervo vago e nervos simpáticos (Dinges et al. 2000, Martín et al. 2004).

Nem todos os *Staphylococcus* produzem enterotoxinas ou a quantidade produzida pode ser insuficiente para causar intoxicação alimentar (Loncarevic et al. 2005). Por outro lado, a mesma amostra de alimento pode conter diferentes isolados de *S. aureus*, portando diferentes genes para enterotoxinas. Isto demonstra a necessidade de se avaliar vários isolados a partir das placas de isolamento, principalmente quando se tratar de casos onde sintomas típicos de intoxicação estafilocócica são observados (Loncarevic et al. 2005).

As toxinas estafilocócicas mais frequentemente identificadas a partir de amostras implicadas em casos de intoxicação alimentar são SEA e SED (Balaban & Rasooly 2000, Fueyo et al. 2001, Villard et al. 2005).

2.4 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma forma de gastroenterite associada à colonização dos alimentos por *S. aureus* e resulta da ingestão de uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos previamente contaminados com a bactéria (Dinges et al. 2000). Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica são cólicas, náuseas, vômitos, às vezes seguidos de diarreia. Outros sintomas como dor de cabeça, dor muscular e prostração podem estar presentes. O período de incubação é curto, variando de 30 minutos a 8 horas e na maioria dos casos, a remissão espontânea é observada após 24 horas. Mortes por intoxicação alimentar estafilocócica não são comuns (Jablonski & Bohach 1999, Le Loir et al. 2003). Apesar disto, é considerada uma doença de alto custo social em termos de despesas com hospitalização, faltas ao trabalho e conseqüente diminuição de produtividade e prejuízo com o descarte de alimentos contaminados (Normanno et al. 2005).

Em todos os casos de intoxicação alimentar estafilocócica, o alimento ou um de seus ingredientes foi contaminado com uma cepa de *S. aureus* produtora de enterotoxina e foi exposto, pelo menos por um período, a temperaturas que permitiram a multiplicação da bactéria. Isto pode ocorrer principalmente por falhas no processo de refrigeração ou quando a temperatura de multiplicação da bactéria é exigida durante o processamento do alimento, por exemplo, na fabricação do queijo. Os alimentos mais

freqüentemente envolvidos na intoxicação alimentar estafilocócica diferem de um país para outro. Isto pode ser explicado pelas diferenças no consumo e hábitos alimentares de cada país. Na França, por exemplo, o consumo de queijo fabricado a partir de leite cru é muito maior do que em países anglo-saxões, o que pode explicar a importância relativa de produtos lácteos envolvidos na intoxicação estafilocócica neste país (De Buyser et al. 2001, Le Loir et al. 2003).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma doença importante em vários países. Admite-se que seja responsável por 185.000 casos/ano de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (Mead et al. 1999). Em Taiwan, *S. aureus* foi responsável por 30% dos casos de surtos de doenças de origem alimentar bacterianas entre 1986 e 1995 (Chiou et al. 2000).

2.5 MANIPULADOR

Como citado, o homem e os animais são os principais reservatórios do *S. aureus*, sendo a cavidade nasal o principal habitat dos estafilococos no homem. Os portadores nasais e os manipuladores de alimentos são importantes fontes de contaminação do alimento (Franco & Landgraf 1996, Jablonski & Bohach 1997, VandenBergh et al. 1999). Outros sítios corporais como a pele, períneo, trato gastrointestinal, trato genital, também podem ser considerados reservatórios da bactéria. Uemura et al. (2004) encontraram tanto portadores nasais quanto orofaríngeos em voluntários saudáveis no Japão, albergando diferentes clones simultaneamente. Na Turquia, manipuladores de alimentos de um hospital apresentaram 16 bactérias diferentes nas mãos, sendo que *S. aureus* foi isolado de 70% das amostras (Ayçiçek et al. 2004).

Acco et al. (2003) apontam que quando se pretende identificar *S. aureus* em estudos epidemiológicos de toxinfecções e em investigação de fontes de contaminação de alimentos, a presença e tipificação de mais de uma cepa de *S. aureus* em manipuladores deve ser determinada. Manipuladores de alimentos portadores de patógenos são freqüentes na indústria alimentícia (Oliveira et al. 2003). A existência de indivíduos envolvidos em surtos de DOA portando múltiplas cepas de *S. aureus* simultaneamente não é rara, se considerarmos que 20% a 40% de pessoas adultas são colonizadas por esta bactéria em alguma época da vida (Jones et al. 2002). Estes indivíduos contaminam alimentos via contato manual ou via trato respiratório através de tosse e de espirro. A contaminação freqüentemente ocorre após tratamento térmico do alimento (Jablonski & Bohach 1997, Le Loir et al. 2003).

Investigando a diversidade genética de *S. aureus* isolados de diversas fontes, em fazendas de leite de cabra do sudeste da França, pela macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE), Vautor et al. (2003) observaram que as bactérias isoladas das mãos dos trabalhadores apresentaram o mesmo perfil eletroforético daquelas isoladas do queijo, demonstrando o papel do manipulador na disseminação de *S. aureus* em fazendas. Observaram ainda, que 80% dos fazendeiros eram portadores nasais de *S. aureus*.

Na América Latina, a ocorrência destes indivíduos é significativa. Alcaráz et al. (1997) identificaram 38,77% dos indivíduos investigados, como portadores nasais de *Staphylococcus* coagulase positiva, em San Luis, Argentina. Em Caracas, Venezuela, um estudo demonstrou a ocorrência de manipuladores portando *Staphylococcus* nas mãos em 5,5% dos casos (Curtis et al. 2000). Figueroa et al. (2002), observaram *S. aureus* em 34% dos manipuladores de alimentos de um restaurante em Santiago, Chile, sendo 54% das cepas, potencialmente toxigênicas.

No Brasil, estudos demonstram alta prevalência de portadores de *S. aureus* entre manipuladores de alimentos. Rêgo et al. (1997), em Recife, PE, encontraram 85,7% dos manipuladores de doze unidades de alimentação e nutrição, portando assintomaticamente esta bactéria. Na Bahia, Cardoso (1999) encontrou 40,5% dos manipuladores de restaurantes industriais contaminados com *S. aureus*. Em Belo Horizonte, MG, 46,7% das amostras colhidas das mãos de funcionários de uma fábrica de pão de queijo, apresentavam a bactéria (Pinto et al. 2001). No Rio de Janeiro, RJ, trabalhadores de uma indústria de embutidos apresentavam *Staphylococcus enterotoxigênicos* nas mãos (11%), narinas (11%) e orofaringe (45,0%) (Maciel et al. 2002). Tondo et al. (2000) encontraram 35,2% dos manipuladores de um laticínio no Rio Grande do Sul colonizados por *S. aureus* e Acco et al. (2003), também no Rio Grande do Sul, identificaram 30% de colonização entre os manipuladores de uma indústria alimentícia.

Vários estudos sugerem que a transferência de bactérias entre o homem e bovinos seja possível. Porém, existem estudos que concordam com o conceito de especificidade de hospedeiros para os *S. aureus*, o que implica que a transferência de bactérias entre os homens e animais não seja um evento freqüente (Roberson et al. 1994, Kapur et al. 1995, Zadoks et al. 2000, Gilot & van Leeuwen 2004, Jørgensen et al. 2005a, Mørk et al. 2005).

2.6 CONTAMINAÇÃO DE ORIGEM ANIMAL - MASTITES

A mastite bovina comumente aparece como resultado da infecção intramamária por bactérias, podendo resultar em doença clínica ou inaparente (Leigh 1999). *S. aureus* é

considerado um patógeno contagioso, disseminando-se rapidamente na granja leiteira, sendo um dos mais freqüentes agentes etiológicos da mastite bovina (Sommerhäuser et al. 2003). Apesar de décadas de pesquisas com o intuito de controlar este patógeno, ele permanece como problema econômico para produtores de leite em geral, determinando perdas econômicas significativas em todo o mundo (Aarestrup et al. 1995, Kapur et al. 1995, Jablonski & Bohach 1997, Su et al. 2000, Buzzola et al. 2001, Nagase et al. 2002, Zadoks et al. 2002). O principal reservatório de *S. aureus* parece ser a glândula mamária infectada e a transmissão entre as vacas ocorre durante a ordenha (Akineden et al. 2001).

Além disso, é também um problema de Saúde Pública, pois resulta na contaminação do leite e derivados antes e durante o processamento (Jablonski & Bohach 1997). Cardoso et al. (1999), demonstraram a produção de TSST-1 por *Staphylococcus* de origem animal e a associação de cepas produtoras de TSST-1 com a mastite bovina em Minas Gerais, Brasil. Stephan et al. (2001) verificaram que 65% dos *S. aureus* isolados de mastites em vacas na Suíça, produziram uma ou mais toxinas, reforçando a importância do animal como fonte de bactérias responsáveis pela intoxicação alimentar do homem, enfatizando especialmente a importância da produção higiênica de leite. Na Alemanha, Zschöck et al. (2005) encontraram 58,7% de cepas toxigênicas isoladas de mastites bovinas.

Alguns autores têm mostrado que poucos clones de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina e estes clones têm ampla distribuição geográfica em diferentes países europeus, Argentina, Japão e Estados Unidos (Annemüller et al. 1999, Akineden et al. 2001, Buzzola et al. 2001, Stephan et al. 2001, Nagase et al. 2002, Vintov et al. 2003a, Jørgensen et al. 2005a, Mørk et al. 2005). No entanto, estudos realizados por Joo et al. (2001) na Coreia, sugerem que as cepas de *S. aureus* são

diferentes entre diferentes propriedades, não apresentando esta ampla distribuição geográfica observada por outros autores.

Estudos utilizando a técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) para comparar cepas de *S. aureus* isoladas de leite com outras isoladas em outros locais da fazenda indicam que a glândula mamária infectada seja a principal fonte da bactéria para os mesmos, inclusive para queijos produzidos na propriedade (Vautor et al. 2003). Carmo et al. (2002) relataram um surto ocorrido no interior de Minas Gerais onde a fonte de *S. aureus* para o leite cru consumido por 328 indivíduos doentes foi a glândula mamária infectada.

2.7 LEITE BOVINO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil 2002). O leite é um dos alimentos mais completos para o ser humano, pois é rico em proteínas, vitaminas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Por essa razão é considerado um excelente meio de cultura para um grande número de microrganismos encontrados na natureza (Silva 1997). Por ser altamente nutritivo, é um produto que está presente na alimentação de todas as idades e classes sociais, destacando-se na dieta de crianças e idosos, expondo esses indivíduos à infecção por microrganismos por ele carregados (Garrido et al. 2001).

No Brasil estima-se que o consumo de leite, em 2005, manteve-se ao redor de 137 litros/habitante/ano, muito abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde que é de 171L/habitante/ano e pelo Guia Alimentar do Ministério da Saúde do Brasil que é de 200L/habitante/ano (EMBRAPA 2005a, Krug 2006).

Logo após deixar o úbere, ainda durante a ordenha, o leite entra em contato com inúmeros microrganismos contaminantes. Esta contaminação é bastante variável, tanto qualitativa quanto quantitativamente, dependendo das condições climáticas da região, da higiene do ordenhador, do ambiente e dos utensílios e equipamentos utilizados no seu processamento (Zadoks et al. 2002). A pasteurização tem como objetivos diminuir o número de microrganismos em geral e eliminar os microrganismos patogênicos que possam estar presentes no leite, tornando-o um produto inócuo ao consumo humano. A legislação brasileira estabelece que o leite destinado ao consumo humano direto, na forma fluida, deve ser pasteurizado à temperatura de 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos ou por pasteurização lenta (62°C a 65°C por 30 minutos) em estabelecimentos de pequeno porte (Brasil 2002).

A contaminação de alimentos por *S. aureus* resulta primariamente da sua presença em produtos de origem animal crus (Vautor et al. 2005), sendo que destes, o principal veículo de *S. aureus* é o leite cru e queijos derivados do mesmo (De Buyser et al. 2001). Em alimentos como carne crua, salsichas, leite cru e queijos derivados, a contaminação de origem animal é mais freqüente devido ao portador animal ou a infecções da glândula mamária (Le Loir et al. 2003, Jørgensen et al. 2005b). No Brasil, num estudo realizado numa indústria de processamento de leite durante 2,5 anos, 90,4% (19/21) das amostras de leite cru analisadas estavam contaminadas. Os resultados sugeriram que o leite cru foi a principal fonte de contaminação dos produtos finais investigados (Tondo et al. 2000).

Em estudo realizado em sete países europeus, observou-se que o leite e seus derivados estavam implicados em 1 a 5% do total de surtos bacterianos, sendo que de 60 destes surtos, envolvendo o leite e seus produtos, a distribuição foi a seguinte: queijo: 53,1%, leite: 39,1% e outros produtos: 7,8%. Do total destes produtos, 32,8% foram

fabricados com leite pasteurizado, 37,5% com leite cru, 10,9% com leite “não pasteurizado” e 18,8% com leite não especificado (De Buyser et al. 2001). Na França, em estudos realizados de 1988 a 1997, o *S. aureus* foi responsável por 10,9% dos surtos, enquanto que em 24,9% deles o veículo foi o leite ou seus derivados (De Buyser et al. 2001).

2.8 QUEIJO MINAS FRESCAL

Entende-se por queijo Minas Frescal o queijo fresco, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo semi-gordo, de alta umidade (46% a 55%), a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico Geral de Identidade e Qualidade de Queijos (Brasil 1996). Segundo o mesmo regulamento, o queijo Minas Frescal deve ser fabricado a partir de leite pasteurizado.

Por suas características de frescor e perecibilidade, o queijo, especialmente o tipo Minas Frescal, amplamente consumido no Brasil, é um alimento potencialmente capaz de transmitir microrganismos e/ou suas toxinas ao consumidor e tem sido associado à intoxicação alimentar estafilocócica (De Luca et al. 1997, Carmo et al. 2002). Segundo a Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA 2005b), no ano de 2004, foram produzidas 28.875 toneladas de queijo Minas Frescal no Brasil.

Estudos em outros países ressaltam a importância da ocorrência deste microrganismo no queijo. De Luca et al. (1997) em Bologna na Itália, detectaram *S. aureus* em 16,3% das 135 amostras de queijo analisadas, com contagens variando de 10^1 UFC/g a $3,0 \times 10^5$ UFC/g. Na França, um levantamento de surtos ocorridos durante 10

anos mostrou que o *S. aureus* foi responsável por 59% dos surtos notificados, envolvendo leite e seus derivados, dos quais, o queijo fabricado a partir de leite cru ou não especificado foi o alimento mais frequentemente implicado (De Buyser et al. 2001).

A avaliação do queijo Minas Frescal comercializado na cidade de Poços de Caldas, MG evidenciou a presença de *S. aureus* em 50% das amostras com contagens acima de 10^3 UFC/g, ou seja, superior ao máximo permitido pela legislação brasileira para este tipo de queijo produzido industrialmente (Almeida Filho & Nader Filho 2000). Sabioni et al. (1993), Cerqueira et al. (1995) e Rodrigues et al. (1995), citados por Almeida Filho & Nader Filho (2000), observaram respectivamente 21,5%, 60% e 100% das amostras de queijo analisadas acima do referido padrão legal.

Loguercio & Aleixo (2001), analisando 30 amostras de queijo Minas Frescal artesanal comercializado na região metropolitana de Cuiabá-MT, observaram que 93,3% das amostras apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de acordo com a legislação vigente, indicando contaminação direta ou indireta com material fecal, sendo assim classificadas como produtos impróprios para o consumo. A presença de *S. aureus* além dos limites aceitáveis foi verificada em 96,7% das amostras e 43,3% delas foram classificadas como potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

Em 95,5% de 45 amostras de queijo, vendidas em três locais diferentes na cidade do Rio de Janeiro, foram detectados elevados níveis de contaminação fecal, sendo que 20% estavam contaminadas com *S. aureus*, dos quais, 17,7% acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. O mesmo trabalho destacou a importância dos queijos frescos como veículo de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas (Araújo et al. 2002).

A contaminação pós-pasteurização, o processo de manipulação, o equipamento, a falta de refrigeração durante transporte e estocagem podem resultar em

índices elevados de microrganismos patogênicos no queijo (Araújo et al. 2002). Os esforços em garantir um produto de qualidade superior não surtem os efeitos esperados. O conhecimento das técnicas de fabricação do queijo e as recomendações pelos órgãos competentes, na prática, não são seguidas e a fiscalização sanitária falha em implementar estas normas.

O trabalho de fiscalização muitas vezes prende-se nas condições higiênicas da indústria e de seus funcionários e a própria matéria-prima pode ser negligenciada. O fato é que o queijo Minas Frescal continua sendo considerado um produto de baixa qualidade microbiológica, com presença de bactérias potencialmente toxigênicas como o *S. aureus* e a fiscalização não demonstra controle efetivo sobre o mesmo. A identificação da fonte mais provável de contaminação do produto final pode auxiliar a melhoria da qualidade do mesmo e minimizar os riscos de intoxicação alimentar pelo consumo do queijo.

2.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus*

Nem sempre é possível estabelecer a fonte de *Staphylococcus* para os alimentos, se humana ou animal (Jablonski & Bohach 1997). Estudos epidemiológicos buscam determinar a origem de microrganismos para alimentos utilizando técnicas de tipificação bacteriana, quando é possível caracterizar microrganismos isolados de possíveis fontes (animais, manipulador, equipamentos e outros fômites) e compará-los fenotípica e genotipicamente com microrganismos isolados dos alimentos. Estes estudos são chamados de “Epidemiologia Molecular” que por definição, é o emprego de técnicas de biologia molecular ao estudo da distribuição e ocorrência de marcadores de doença em uma população (Foxman & Riley 2001). Suas aplicações práticas incluem a identificação de microrganismos responsáveis por doenças infecciosas e determinação de sua fonte,

relações biológicas, mecanismos de transmissão e os genes responsáveis pela virulência, antigenicidade e resistência a drogas (Levin et al. 1999).

Variações consideráveis na ocorrência e severidade das infecções causadas por microrganismos classificados como membros da mesma espécie têm sido descritas. Como resultado do entendimento das bases microbiológicas destas variações, uma variedade de métodos de tipificação foi desenvolvida usando marcadores sorológicos e fenotípicos. Estes conhecimentos revelam que as cepas bacterianas mantêm sua integridade genética por longos intervalos de tempo e distâncias, ou seja, seus genomas não são facilmente desorganizados ou reorganizados por mutações e recombinações recorrentes. Esta visão da estrutura genética de populações bacterianas é conhecida como “conceito do clone” (Levin et al. 1999).

Gerações de microbiologistas têm observado que isolados da mesma espécie, não relacionados epidemiologicamente, sempre diferem em múltiplas características. Sistemas de tipificação são baseados na premissa que isolados clonalmente relacionados podem apresentar características pelas quais podem ser diferenciados de isolados não relacionados (Arbeit 1999).

Sistemas de tipificação são usados para definir características do seu objeto de estudo. Os procedimentos são específicos para diferentes parâmetros fenotípicos ou genéticos e podem ser gerais (aplicáveis a qualquer espécie microbiana) ou espécie e/ou gênero específicos. Ótima tipabilidade, alto grau de reprodutibilidade, estabilidade adequada e um grande poder de resolução caracterizam uma técnica de tipificação padrão ouro (“gold standard”). É recomendável que os procedimentos possam ser facilmente acessíveis e não sejam onerosos ou de execução complicada. Técnicas mediadas por ácidos nucleicos são mais freqüentemente aplicadas e mais recomendadas do que procedimentos orientados por características fenotípicas em estudos de taxonomia,

epidemiologia e evolucionários. Vários métodos para determinação de variações genéticas entre isolados microbianos têm sido descritos, cada um com limitações dependentes de alvos no ácido nucléico, que devem ser consideradas quando são realizados estudos de tipificação molecular e subsequente cálculo das relações entre cepas. O método a ser utilizado deve ser determinado pela natureza das questões a serem respondidas (van Belkum et al. 2001).

2.10 TIPIFICAÇÃO MICROBIANA

Em geral existem diferenças genéticas substanciais dentro de uma mesma espécie microbiana e os isolados são distribuídos entre cepas ou cepas geneticamente divergentes. Estas divergências evolucionárias refletem a ocorrência de mutações ao acaso, não letais, incluindo substituições de pares de bases, deleção de genes individuais ou aquisição de DNA de outras espécies. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares altamente sensíveis, alterações sutis no genoma podem ser precisamente detectadas (Arbeit 1999).

Não existe nenhuma técnica padrão ouro pela qual se julgue um método de tipificação ou que consistentemente forneça resultados verdadeiramente positivos ou negativos. Conseqüentemente, os resultados de sistemas de tipificação devem ser considerados relativamente a dados epidemiológicos, juntamente com outros parâmetros. Alguns dos critérios utilizados na avaliação de sistemas de tipificação incluem: 1) tipabilidade - habilidade em obter resultados para os isolados analisados sem ambigüidade; 2) reprodutibilidade – habilidade da técnica em obter o mesmo resultado quando a mesma cepa é testada repetidamente, e 3) poder discriminatório – habilidade em diferenciar cepas não relacionadas (Tenover et al. 1994, Arbeit 1999).

Um isolado microbiano, ou estoque, é uma coleção de células derivadas como monocultura de uma colônia primária em meio sólido no qual a fonte do isolado foi inoculada. Esta última pode ser tão diversa quanto um espécime clínico de um paciente ou uma amostra de solo. Uma cepa ou cepa representa um isolado ou grupo de isolados apresentando características genéticas ou fenotípicas específicas que diferenciam de outros isolados pertencentes à mesma espécie. Uma cepa de referência é uma amostra bem caracterizada que é preservada “in vitro” e usada em estudos subsequentes para comparação. Um clone (ou grupo clonal de isolados ou cepas) compreende organismos descendentes de um ancestral comum por cadeia direta de replicação. A identificação de clones deve-se basear em monitoramento cuidadoso de vários marcadores moleculares de poder discriminatório suficiente. Um clone genético compreende um grupo de cepas que são completamente idênticas em nível de DNA (van Belkum et al. 2001).

Epidemiologistas monitoram a dispersão de vírus, bactérias, fungos e protozoários associados a infecções humanas ou animais. Os riscos à saúde pública podem ser determinados e intervenções na disseminação da doença podem ser delineadas e a eficácia atingida. A epidemiologia microbiana é útil para traçar as estratégias de sobrevivência e virulência de microrganismos patogênicos ou multirresistentes como parte de sistemas de vigilância (van Belkum et al. 2001).

Avaliando um sistema de tipificação para perspectivas ecológicas e epidemiológicas, vários atributos devem ser considerados, incluindo a habilidade para tipificação de cepas, reprodutibilidade e estabilidade de padrões e poder discriminatório. Uma combinação de métodos de tipificação fenotípicos e genotípicos é a melhor forma para compreensão da epidemiologia da intoxicação alimentar estafilocócica (Shimizu et al. 2000).

2.10.1 Técnicas de tipificação microbiana

As técnicas de tipificação microbiana podem ser fenotípicas, que detectam características expressas pelos microrganismos, e genotípicas, que envolvem análise baseada diretamente no DNA cromossômico ou de elementos genéticos extracromossômicos (Arbeit 1999).

As técnicas fenotípicas são limitadas pela capacidade dos microrganismos em alterar a expressão de genes. Mutações pontuais podem resultar em regulação anormal ou alteração funcional do gene responsável por um fenótipo determinado. Assim isolados da mesma espécie, geneticamente indistinguíveis, podem apresentar fenótipo variado. Outra limitação das técnicas é que o material disponível pode não ser apropriado para todas as cepas e grande parte destas podem apresentar fenótipo nulo e serem, conseqüentemente, não tipificáveis. São técnicas fenotípicas mais comuns a biotipificação, que se refere ao padrão de atividades metabólicas expressas por um isolado incluindo reações bioquímicas, morfologia colonial e tolerância ambiental; o teste de susceptibilidade a antimicrobianos ou antibiograma; a sorotipificação, que se baseia nas diferenças de determinantes antigênicos expressos na superfície celular dos microrganismos; a fagotipificação, que determina a susceptibilidade ou resistência das cepas isoladas à lise por bacteriófagos padrões; a eletroforese enzimática (MLEE “multilocus enzyme electrophoresis”) onde os isolados são analisados pela diferente mobilidade eletroforética de determinadas enzimas metabólicas que apresentam (Arbeit 1999).

Os problemas associados a muitas técnicas fenotípicas estimularam o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de tipificação baseados em DNA, que têm se revelado como preferenciais para tipificação de cepas dos patógenos bacterianos mais comuns, tanto em laboratórios clínicos quanto de referência (Arbeit 1999).

Técnicas genotípicas que envolvem análise de DNA têm sido aplicadas à tipificação microbiana, porém, nenhuma delas combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade, além da complexidade na interpretação de resultados e aplicação efetiva a estudos epidemiológicos (Arbeit 1999).

São exemplos de técnicas genotípicas, a análise plasmidial, que sofre as limitações inerentes ao fato de que os plasmídios são móveis, extracromossomais e, portanto, não fazem parte do genótipo cromossomal que define as cepas; análise por enzimas de restrição (REA de DNA cromossomal) que se baseia no tratamento do DNA por endonucleases gerando fragmentos que podem ser separados e observados por eletroforese em gel de agarose; a técnica de “southern blot”, que se baseia na digestão do DNA bacteriano, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose e transferência (“blotting”) dos fragmentos para uma membrana de nitrocelulose ou nylon onde são então detectados usando-se sonda marcada. A ribotipificação, que se refere a uma análise “southern blot” onde as cepas são caracterizadas por RFLP (“restriction fragment length polymorphisms”) associadas a operon (s) ribossomal (is); eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) que consiste na digestão do DNA por enzimas de restrição que resultam em fragmentos relativamente grandes, os quais são observados após corrida em gel de agarose em campo elétrico cuja orientação é mudada periodicamente (pulsada); sistema de tipificação aplicando PCR como, AP-PCR (“arbitrarily primed PCR”), que é a reação em cadeia da polimerase utilizando seqüências iniciadoras arbitrárias, rep-PCR, PCR baseado em seqüências cromossomais repetidas e análise da seqüência de nucleotídeos (Arbeit 1999).

Durante a última década, vários estudos têm utilizado métodos tradicionais de tipificação bacteriana juntamente com técnicas moleculares para caracterização de cepas de *S. aureus* (Linhardt et al. 1992, Aarestrup et al. 1995, Fitzgerald et al. 1997,

Hoefnagels-Schuermans et al. 1997, Essawi et al. 1998, Na'was et al. 1998, Rodgers et al. 1999, Vanderlinde et al. 1999, Tondo et al. 2000, Crisóstomo et al. 2001, Marsou et al. 2001, Oliveira et al. 2001, Stephan et al. 2001, Grundmann et al. 2002, Montesinos et al. 2002, Nagase et al. 2002, Nascimento et al. 2002, Zadoks et al. 2002, Acco et al. 2003, Gialluly et al. 2003, Hennekinne et al. 2003, Sommerhäuser et al. 2003, Goñi et al. 2004, van Duijkeren et al. 2004, Mørk et al. 2005, O'Mahony et al. 2005).

Historicamente, os isolados vêm sendo diferenciados por métodos fenotípicos de tipificação, incluindo a susceptibilidade antimicrobiana e fagotipificação. Ambos os métodos têm limitações, pois isolados não relacionados geneticamente podem ter o mesmo perfil de susceptibilidade antimicrobiana e alguns isolados de *S. aureus* não são tipificados pela fagotipificação (Shopsin & Kreiswirth 2001).

A fagotipificação tem sido usada tradicionalmente como um instrumento epidemiológico para determinar a fonte da contaminação estafilocócica e identificação de casos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (Vanderlinde et al. 1999). Apesar de ser amplamente utilizada em vários laboratórios de referência pelo mundo para estudos epidemiológicos envolvendo *Staphylococcus aureus* (Tenover et al. 1995, Mc Cullagh et al. 1998), a fagotipificação apresenta alguns problemas: 1) caracteriza isolados baseando-se em marcadores fenotípicos de baixa reprodutibilidade, 2) não realiza a tipificação de todos os isolados e 3) requer manutenção de fagos e cepas de propagação, limitando sua utilização (Bannerman, et al. 1995). Além disso, seu poder discriminatório tem sido questionado, especialmente onde cepas animais estão envolvidas, pois muitas delas são susceptíveis aos mesmos fagos que as cepas de origem humana (Vanderlinde et al. 1999).

A introdução de métodos de genotipificação baseados em análise de DNA tem melhorado significativamente a eficiência da tipificação epidemiológica (Montesinos et al. 2002). Marcadores genotípicos discriminam mais do que marcadores fenotípicos, porém a

combinação de dois ou mais métodos vem sendo recomendada (Marsou et al. 2001). Faz-se necessário um método de tipificação que possa ser aplicado a um grande número de espécies bacterianas e a técnica de RFLP seguida de PFGE satisfaz esta necessidade (Tenover et al. 1995). O PFGE tem se mostrado o marcador mais confiável para tipificação de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA), sendo um método altamente discriminatório, estável e reprodutível (Olive & Bean 1999, Montesinos et al. 2002).

A aplicação de técnicas moleculares ao estudo de organismos heterogêneos implementa estudos epidemiológicos pela melhoria na capacidade de subclassificar estes organismos em grupos representativos. Isto facilita a detecção de surtos de doenças e permite ao epidemiologista a identificação de fatores de risco de surtos, de casos esporádicos ou de ambos (Foxman & Riley 2001).

A habilidade de discriminação entre genomas é essencial em várias disciplinas, inclusive em epidemiologia molecular. Para a tipificação microbiana, a fonte de organismos a ser estudada deve ser bem definida. O habitat natural de onde as células são isoladas é importante para interpretação de resultados de tipificação molecular e para inferir conclusões adequadas (van Belkum et al. 2001).

2.10.1.1 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos - Antibiograma

Entre os métodos de tipificação que têm sido aplicados para comparar cepas de *S. aureus*, identificar mecanismos de transmissão e fontes de contaminação, o antibiograma tem sido rotineiramente utilizado especialmente por sua ampla disponibilidade, rigoroso controle de qualidade, baixo custo, fácil execução e contribuição

para o conhecimento sobre a resistência dos microrganismos a antimicrobianos (Arbeit 1999, Zadocks et al. 2000).

Para estudos epidemiológicos detalhados, como de infecções nosocomiais, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos possui relativa limitação de uso não somente pela variação fenotípica que as cepas podem apresentar, mas também porque a resistência está sob extraordinária pressão seletiva dentro dos hospitais. Existem vários mecanismos genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana, como mutações pontuais e aquisição de genes de resistência mediados por plasmídeos e transposons. A transmissão desses genes pode acontecer entre cepas ou entre espécies. Por outro lado, na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos. Como consequência destes mecanismos de variação genética, cepas diferentes podem apresentar perfis de resistência semelhantes e a mesma cepa pode apresentar perfis de susceptibilidade diferentes para um ou mais antibióticos (Arbeit 1999).

Tenover et al. (1994) ressalta que apesar das limitações relacionadas ao poder discriminatório da técnica, o antibiograma tem fácil utilização e interpretação, e deve ser utilizado em laboratórios de rotina como triagem para determinação de correlação entre cepas.

Devido à frequência de doenças causadas por *S. aureus*, muitos antibióticos têm sido introduzidos para uso terapêutico no homem e animais nas últimas décadas. Os principais grupos destes antibióticos são, entre outros, as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, carbapenems. Entretanto, cepas resistentes à penicilina, estreptomicina, eritromicina e tetraciclina têm emergido. A partir de 1960, a meticilina e oxacilina têm sido usadas no controle das infecções estafilocócicas, porém a frequência de MRSA tem aumentado em vários países (Tsen et al. 1998).

Em Taiwan, um estudo avaliando cepas de *S. aureus* obtidas de alimentos e isolados clínicos, constatou a alta frequência de resistência à penicilina das bactérias isoladas de alimentos, provavelmente devido ao uso comum deste antibiótico no país (Tsen et al. 1998). O nível de resistência a antimicrobianos por *S. aureus* de origem bovina na Dinamarca, tem aumentado muito pouco quando comparado a outros países, apesar do uso regular de penicilinas e outros agentes antimicrobianos em animais leiteiros (Vintov et al. 2003b).

Num estudo na Suíça, o antibiograma revelou que 100% das 34 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina foram susceptíveis a cefoperazone, oxacilina, cefalotina, gentamicina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, lincomicina e eritromicina. Trinta e um isolados (91,2%) foram susceptíveis a todos os antibióticos testados. Dos restantes, dois foram resistentes à penicilina G/ampicilina e um à polimixina B (Stephan et al. 2001).

Em *S. aureus* de origem bovina, isolados em nove países europeus e EUA, foi encontrada resistência à penicilina, em média, em 32,4% (2% a 71,4%) das 815 cepas avaliadas. Metade (50,1%) dos isolados foi susceptível a todos os 21 antibióticos testados. Neste estudo foi observado um grande número de tipos de *S. aureus* causadores de mastite bovina, apesar da predominância de alguns. A resistência à penicilina esteve amplamente disseminada entre cepas causadoras de mastite bovina, mas a resistência a outros agentes antimicrobianos foi limitada. Os resultados demonstraram que o uso de penicilina no ambiente de criação de bovinos tem selecionado tipos específicos de *S. aureus* em países onde a resistência é muito freqüente (Vintov et al. 2003a).

A veiculação de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos por alimentos pode ocorrer em função da colonização destes microrganismos nos alimentos prontos ou suas matérias-primas. Costa et al. (2000), em São Paulo, Brasil, encontraram cepas de *Staphylococcus* isoladas do parênquima mamário apresentando alta resistência *in vitro* a

antimicrobianos, atribuindo este fato ao insucesso das terapias anti-mastite e/ou mastites recorrentes crônicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Gündoğan et al. (2005) na Turquia, reforçando o risco de transmissão de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos ao homem pelo consumo de leite. De Oliveira et al. (2000) sugerem que técnicas de manejo de gado bovino visando o controle de mastites sejam utilizadas em conjunto com terapia antimicrobiana, no controle desta doença em bovinos.

A principal desvantagem da tipificação pelo antibiograma consiste na variabilidade da expressão da resistência que também é susceptível à instabilidade devido à transmissão horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos (Montesinos et al. 2002). O antibiotipo ainda é válido como primeira aproximação da origem clonal ao comparar dois isolados bacterianos, especialmente em laboratórios de rotina (Hoefnagels-Schuermans et al. 1997). Para uma boa aproximação sempre se deve considerar a epidemiologia do microrganismo, a genética bacteriana, os perfis de susceptibilidade habituais e os mecanismos moleculares de resistência. Finalmente é importante saber identificar no perfil de susceptibilidade, um bom marcador que permita aproximar-se à clonalidade entre isolamentos bacterianos (Labarca 2002).

Um dos principais *Staphylococcus* patogênicos em infecções nosocomiais no homem é o MRSA. Desde que foi primeiramente descrito na Inglaterra em 1961, pouco depois da introdução da metilina em 1959 (Mulvey et al. 2001), o MRSA tem sido encontrado em vários países. É uma bactéria clinicamente importante por apresentar resistência cruzada a antibióticos beta-lactâmicos, inclusive às cefalosporinas e ainda tem demonstrado resistência a vários outros agentes antimicrobianos como aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas, exceto à vancomicina (Hoefnagels-Schuermans et al. 1997, Shimizu et al. 1997a, Seguin et al. 1999).

O isolamento de MRSA de animais foi descrito primeiramente por Devriese et al. em 1972 (citado por O'Mahony et al. 2005) que isolaram o organismo do leite de vacas mastíticas. Outros estudos evidenciaram a presença de MRSA em cães, eqüinos, gato, coelho e foca (Shimizu et al. 1997a, Seguin et al. 1999, van Duijkeren et al. 2004, O'Mahony et al. 2005). O'Mahony et al. (2005), avaliando MRSA isolados a partir de animais e tratadores de animais em hospital veterinário na Irlanda, concluíram que a transmissão entre animais e homem tem importância veterinária e em saúde pública, exigindo medidas de controle da infecção animal por MRSA durante o manejo dos mesmos.

A evolução molecular de MRSA que tem ocorrido ao longo do tempo e envolve tanto transferência horizontal de genes quanto a disseminação clonal de certas cepas (van Belkum et al. 2001). Estudos epidemiológicos moleculares conduzidos em vários países desde a década de 1980, claramente indicam que o fator principal para disseminação geográfica massiva de MRSA é a disseminação de relativamente poucos clones epidêmicos (Crisóstomo et al. 2001). Cinco clones de MRSA distintos foram identificados em todo o mundo, desde o isolamento da primeira cepa no Reino Unido em 1961 (Chambers 2001, Vivoni & Moreira 2005). No Brasil, a prevalência do isolamento de cepas de MRSA varia de 40% a 80% na maioria dos hospitais. A disseminação do clone endêmico brasileiro (BEC) tem sido descrita em vários hospitais no Brasil, América do Sul (Argentina, Uruguai, Chile) e Europa (Portugal, República Tcheca) (Oliveira et al. 2001, Vivoni & Moreira 2005).

Tradicionalmente infecções por MRSA são adquiridas em hospitais e instituições similares. Fatores de risco para colonização ou infecção por MRSA em hospitais incluem principalmente exposição a antibióticos, passagem por unidades de terapia intensiva, cirurgia e contato com paciente colonizado (Chambers 2001).

A penicilinase é tipicamente codificada por plasmídeo e pode ser facilmente transferida por transdução ou conjugação. Estas características contribuem para que cepas produtoras de penicilinase, meticilina susceptíveis sejam geneticamente diversas e policlonais. Ao contrário da penicilinase codificada por plasmídeo, o gene *mec* determinante de resistência à meticilina é codificado no cromossomo bacteriano. A transferência horizontal do gene *mec* é sabidamente rara (Chambers 2001).

A resistência antimicrobiana à penicilina, meticilina e vancomicina certamente é consequência da pressão seletiva da exposição a antibióticos. A questão não é se a resistência vai ocorrer, mas como ela vai acontecer. A minimização da pressão antibiótica que favorece a seleção de cepas resistentes é essencial ao controle da emergência destas cepas em hospitais e na comunidade (Chambers 2001).

A emergência de bactérias multi-resistentes a antibióticos tem-se constituído no maior desafio no tratamento de doenças infecciosas e, portanto um problema de saúde pública. Isto demanda a identificação e controle das fontes de contaminação e dos mecanismos de transmissão (Goñi et al. 2004).

2.10.1.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (PFGE)

A introdução de métodos de genotipificação baseados em análise de DNA tem melhorado significativamente os resultados de tipificação epidemiológica. A macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) tem se mostrado como o marcador epidemiológico mais confiável para tipificação de MRSA, visto que é um método altamente discriminatório, estável e reprodutível (Shimizu et al. 2000, Montesinos et al. 2002, Strandén et al. 2003).

A técnica desenvolvida por Schwartz e Cantor em 1984 é uma variação da eletroforese em gel de agarose, onde o campo elétrico varia periodicamente, ou seja, é

pulsado. Envolve a digestão do cromossomo por endonucleases de restrição específicas, como a *SmaI* para *S. aureus*, que têm relativamente poucos sítios de reconhecimento, gerando perfis de cinco a 20 fragmentos de DNA de aproximadamente 10 a 800 kb. A eletroforese destes fragmentos permite a visualização do perfil de restrição, que compreende uma série de bandas com tamanhos diferentes que podem ser separados efetivamente no campo pulsado. A relação entre os isolados bacterianos é inferida pela similaridade dos perfis de restrição originados. Teoricamente, todos os isolados bacterianos podem ser tipificados por esta técnica (Arbeit 1999, Singer et al. 2004).

O índice de mutação, incluindo mutações pontuais, rearranjos genéticos e transferência horizontal de elementos móveis como fagos e transposons, é diferente entre as diferentes espécies bacterianas. Em um sistema de tipificação, o índice de mutação vai influenciar diretamente a estabilidade dos padrões de tipificação durante os ciclos de replicação de um dado clone bacteriano. Assim para um determinado microrganismo, a interpretação epidemiológica de padrões de PFGE vai depender das escalas de tempo e espaço considerados (Blanc et al. 2001, Singer et al. 2004).

O método requer interpretação subjetiva e comparação dos perfis de restrição e imagens (Singer et al. 2004). A utilização de programas computadorizados para comparação de perfis tem aprimorado a interpretação dos resultados obtidos por PFGE (Shopsin & Kreiswirth 2001).

A técnica de PFGE tem sido aplicada com sucesso à tipificação de um grande número de organismos gram-negativos, gram-positivos e espécies de micobactérias (Matushek et al. 1996, Arbeit 1999, Blanc et al. 2001), apesar de possuir limitações como o tempo gasto na sua execução e o custo, exigindo equipamento eletroforético e softwares especializados e onerosos (Arbeit 1999, Senna et al. 2002).

Em relação ao *S. aureus*, o PFGE tem sido utilizado em várias investigações epidemiológicas de infecções hospitalares e também tem sido usado para determinação da fonte da bactéria em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Tenover et al. 1997, McCullagh et al. 1998, Suzuki et al. 1999, Chiou et al. 2000, Shimizu et al. 2000, Joo et al. 2001, Labarca 2002, Martín et al. 2004). Pode ser usada com diferentes propósitos genéticos e epidemiológicos, como para comparar e classificar isolados, mapear sondas de genes representativos, estimar o tamanho do genoma de cada cepa e analisar a relação genética entre cepas (Martín et al. 2004).

A fagotipificação, tradicionalmente utilizada como técnica padrão ouro para tipificação de *S. aureus*, ainda hoje é amplamente utilizada, apesar de apresentar algumas desvantagens que incluem: tipabilidade limitada dos isolados, reprodutibilidade técnica dos resultados limitada e expressão variada dos determinantes epidemiológicos resultando em reprodutibilidade biológica limitada. Este método vem sendo substituído pelo PFGE, pois apresenta maior reprodutibilidade laboratorial do que a tipificação binária e fagotipificação e maior poder discriminatório do que a fagotipificação (Zadoks et al. 2002). A grande vantagem desta técnica é sua habilidade em tipificar cepas que não puderam ser fagotipificadas (Hennekinne et al. 2003).

Quando comparada à fagotipificação, Shimizu et al. (1997b) demonstraram que a técnica de PFGE obteve melhores resultados em cepas isoladas de aves, onde a fagotipificação não conseguiu caracterizar todas as cepas. Vanderlinde et al. (1999) obteve resultados semelhantes avaliando *S. aureus* isolados de carne crua quando comparados aos resultados obtidos por fagotipificação. Zadoks et al. (2002), comparando isolados obtidos de bovinos, homem, equipamento de ordenha e leite bovino através de PFGE, tipificação binária e fagotipificação, concluíram que a técnica de PFGE mostrou melhor tipabilidade e maior poder discriminatório.

PFGE e MLST (“multilocus sequence typing”) apresentam habilidades discriminatórias similares em alguns estudos. Para muitas aplicações epidemiológicas estritas, PFGE permanece como sistema de tipificação de escolha com o MLST reservado para estudos epidemiológicos longos e estudos de populações genéticas (Peacock et al. 2002).

Chiou et al. (2000) demonstraram que PFGE foi um método mais preciso para tipificação molecular de *S. aureus* do que a análise do perfil de restrição do gene da coagulase (CRP), quando procederam a caracterização molecular de *Staphylococcus* isolados a partir de pacientes e manipuladores de alimentos. A técnica é útil para investigar formas de contaminação de alimentos por *Staphylococcus* e distinguir os biotipos tradicionais de *S. aureus*, apresentando maior poder discriminatório do que a tipificação bioquímica (Hennekinne et al. 2003).

A técnica de PFGE é o melhor método para tipificação de cepas de MRSA (Saulnier et al. 1993, Kumari et al. 1997, Shimizu et al. 2000, Strandén et al. 2003), apesar de que esta tem-se mostrado particularmente difícil porque a maioria das cepas é derivada de poucos clones (Tenover et al. 1994).

Vários estudos de tipificação bacteriana tentam caracterizar *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastites bovinas utilizando diversos métodos como: fagotipificação (Fox et al. 1991, Aarestrup et al. 1997), ribotipificação (Rivas et al. 1997), polimorfismo do gene da coagulase (Su et al. 2000), tipificação binária (Zadoks et al. 2000) eletroforese enzimática (Fitzgerald et al. 1997), PCR (Mathews et al. 1994, Lipman et al. 1996) e PFGE (Lange et al. 1999, Joo et al. 2001, Buzzola et al. 2001, Stephan et al. 2001). Através do PFGE, procura-se caracterizar os tipos de *Staphylococcus* isolados dos animais e compará-los com os isolados obtidos em diferentes propriedades e até regiões maiores (Fitzgerald et al. 1997, Lange et al. 1999, Zadoks et al. 2000, Buzzola et al. 2001,

Joo et al. 2001, Stephan et al. 2001). Com isto, pode-se estabelecer os tipos mais prevalentes envolvidos na etiologia da mastite.

Em relação à origem de *S. aureus* em alimentos, quase sempre atribuída a manipuladores, Tondo et al. (2000), utilizando a técnica de PFGE, observaram em uma indústria leiteira na região de Porto Alegre/RS, que a fonte de *S. aureus* presente nos produtos finais foi provavelmente o leite cru e não os manipuladores. Jørgensen et al. (2005b), na Noruega, também atribuíram ao leite cru a fonte de contaminação de *S. aureus* em produtos derivados envolvidos em surto de intoxicação alimentar estafilocócica.

3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que uma importante fonte de microrganismos para os alimentos é o manipulador que entra em contato com os mesmos em toda a cadeia de sua produção. Vários procedimentos e sistemas de qualidade visam minimizar a contaminação dos alimentos, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC), mundialmente aplicados. No entanto, com estudos de tipificação bacteriana, têm-se demonstrado que a fonte de *S. aureus* para o queijo Minas Frescal pode ser a matéria-prima e não apenas os manipuladores como geralmente pensado (Tondo et al. 2000).

Com base nestes fatos, o conhecimento das fontes de *Staphylococcus aureus* para o queijo Minas Frescal, um produto muito consumido em Goiás, permitiria a adoção de medidas sanitárias na produção de leite e manipulação dos produtos derivados com o objetivo de minimizar a contaminação final por esta bactéria, cuja elevada prevalência, nestes tipos de alimentos e pela importância como agentes de intoxicações alimentares, justifica um estudo pormenorizado.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar *Staphylococcus aureus* isolados de amostras coletadas em laticínio de Goiás, visando estabelecer relação de contaminação entre a matéria-prima, o manipulador e o produto final (queijo Minas Frescal).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Isolar, identificar e quantificar *S. aureus* a partir de amostras de leite cru e de queijo Minas Frescal;

4.2.2 Isolar e identificar *S. aureus* a partir de amostras coletadas da nasofaringe e mãos de manipuladores envolvidos na fabricação do queijo analisado;

4.2.3 Realizar o antibiograma como teste fenotípico de tipificação dos *S. aureus* isolados;

4.2.4 Realizar a técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) como teste genotípico de tipificação de *S. aureus* isolados;

4.2.5 Comparar os *S. aureus* isolados das diferentes fontes (manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal) visando investigar a possível fonte da bactéria para o produto final (queijo).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM:

Foram coletadas 140 amostras em um laticínio do estado de Goiás sendo 24 de leite cru, 24 de queijo Minas Frescal e 92 amostras provenientes de manipuladores (46 de nasofaringe e 46 de mãos), no período de março de 2004 a fevereiro de 2005. O laticínio está localizado numa cidade próxima a Goiânia e recebe entre 2.700 a 3.200 litros de leite (dependendo da época do ano), proveniente de fazendas da região. O leite recebido é utilizado na produção de leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal. São produzidos em média 110 kg de queijo ao mês. O laticínio possui quatro funcionários envolvidos na produção do queijo. Estes funcionários exercem outras funções como, recepção do leite, embalagem de queijo, processamento de leite pasteurizado, higienização da fábrica e latões, etc.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS:

Durante visitas bimensais ao laticínio, foram colhidas as amostras:

- Leite cru: 250 mL do leite utilizado na preparação do queijo;
- Queijo Minas Frescal: cada amostra se constituiu de uma unidade de queijo fabricada;
- Manipuladores: com swab esterilizado, foram coletadas amostras da nasofaringe e mãos. Os swabs eram dispensados em tubos individuais contendo caldo cérebro-coração (BHI).

As amostras coletadas eram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e remetidas ao laboratório.

5.3 LOCAL DAS ANÁLISES:

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Ambientes e de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

5.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS:

5.4.1 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*:

- Leite cru: Após homogenização, alíquotas de 0,1 ml do leite cru e das diluições seriadas subsequentes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) preparadas em água peptonada 0,1% tamponada (H_2PO_4), eram inoculadas em superfície de Ágar Baird-Parker adicionado de solução de gema de ovo a 50% e solução aquosa de telurito de potássio a 1% e distribuídas com alça de Drigalsky. As placas eram incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação, das placas que apresentavam entre 20 e 200 colônias, eram contadas colônias típicas (negras, brilhantes com anel opaco rodeadas por um halo transparente) e atípicas (acinzentadas ou negras, brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos). Eram selecionadas 3 a 5 colônias típicas e atípicas para inoculação em BHI e incubação a 37°C/24 horas (Lancette & Tatini, 1992).

- Queijo Minas frescal: Após homogeneização de 25g de queijo em 225 mL de H_2PO_4 tamponada em homogenizador do tipo “stomacher” (diluição 10^{-1}), as diluições subseqüentes eram analisadas como o leite cru (Lancette & Tatini, 1992).

5.4.2 Isolamento de *Staphylococcus*

- Suabes de nasofaringe e mãos: após incubação dos suabes em BHI a 37°C/24 h, as amostras eram semeadas em superfície de ágar Manitol salgado e as placas incubadas a 37°C/24-48 horas (Kloos & Bannerman, 1999). Após a incubação, eram selecionadas colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Staphylococcus* para identificação.

5.4.3 Identificação (Bennett & Lancette 2001)

- Das colônias consideradas suspeitas de pertencerem ao gênero *Staphylococcus*, foram realizadas as seguintes provas: coloração de Gram, prova da catalase, prova da coagulase, prova da termonuclease, produção de acetoina (teste do VP) e fermentação anaeróbica da glicose e manitol. As colônias identificadas como *S. aureus* foram submetidas ao antibiograma e PFGE.

5.4.4 Antibiograma

- Como teste fenotípico de tipagem bacteriana, foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos utilizando-se a técnica de difusão em placas (NCCLS, 2003). Foram testados os seguintes antimicrobianos: Eritromicina (15 :g), Ciprofloxacina (05 :g), Tetraciclina (30 :g), Gentamicina (120 :g), Vancomicina (30 :g), Oxacilina (01 :g) e Penicilina (10UI). A cepa padrão ATCC 25923 foi usada como controle.

5.5.5 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE)

Como teste genotípico de tipificação bacteriana, foi realizada a macrorrestrição de DNA cromossomal seguida de PFGE, segundo o protocolo descrito por Mulvey et al. (2001) com algumas modificações.

- Preparação das células - Uma colônia de cada isolado de *S. aureus* era inoculada em 3 mL de BHI e incubada a 37°C/16-18h. Em seguida, 500 :L do cultivo era centrifugado a 18.000 rpm/1 min. O sedimento era ressuspendido em 150 :L de tampão de suspensão (10 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 20 mM de NaCl, 50 mM de EDTA) e misturado a 7 :L de lisostafina (1mg/mL) e a 150 :L de agarose “low melting point” a 2% para confecção dos “plugs”.
- Lise celular – As células nos “plugs” eram lisadas em tampão de lise (10 mM Tris-Cl pH 7,2, 50 mM NaCl, 100 mM, 50 mM EDTA, 0,2% desoxicolato de Na, 0,5% sarcosil) por 1h a 37°C seguido de incubação a 50°C/0,5h em 1 mL de tampão de Proteinase K (PK) (250 mM EDTA pH 9,0, 1% de sarcosil) e 60U/mL de PK. Após a incubação, os “plugs” eram lavados quatro vezes em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA).
- Digestão do DNA – 1/3 dos “plugs” de cada amostra eram estabilizados em 300 :L de tampão da enzima 1X por 10 min a temperatura ambiente e então digeridos com 20U de endonuclease de restrição *SmaI* por 4h a 25°C.
- Separação dos fragmentos de restrição – os fragmentos de DNA digeridos foram separados por corrida em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X (Tris 0,5 M borato EDTA). Foi usado o marcador de peso molecular lambda (Bio-Rad) e também uma cepa controle em cada gel. A eletroforese foi realizada em aparelho CHEF DR II (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nas seguintes condições: voltagem = 6V/cm, tempo = 18 h, temperatura = 14°C, pulso inicial de 5,3s e final de 34,9s. Após a eletroforese, o gel era corado por 1h com brometo de etídio (0,5mg/L e fotografado em transiluminador sob luz UV.

- Interpretação dos resultados – a interpretação foi realizada visualmente de acordo com os parâmetros estabelecidos por Tenover *et al.* (1995) e por análise computadorizada (BioNumerics, v. 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Jensen NE, Jonsson O, Myllys V, Thorberg BM, Waage S, Rosdahl VT 1997. A study of phage and ribotype patterns of isolated from bovine mastitis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand* 38: 243-252.
2. Aarestrup FM, Wegener HC, Rosdahl VT 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet Microbiol* 45: 139-150.
3. Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol* 20: 489-493.
4. Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, Lämmle C, Wolter W, Zschöck M 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immun* 8: 959-964.
5. Almeida Filho ES, Nader Filho A 2000. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Rev Saúde Pública* 34: 578-80.
6. Annemüller C, Lämmle C, Zschöck M 1999. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 69: 217-224.
7. Alouf JE, Muller-Alouf H 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 292: 429-40.
8. Alcaráz LE, Satores SE, Sepúlveda L, Centorbi ONP 1997. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. *La Aliment Latinoam* 219: 44-47.
9. Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* 92: 1172-7.
10. Arbeit RD 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH

(eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology, Washington, p. 116-137.

11. Ayçiçek H, Aydoğan H, Küçükbaraaslan A, Baysallar M, Basustaoglu AC 2004. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control* 15: 253-259.
12. Balaban N, Rasooly A 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61: 1-10.
13. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 33: 551-555.
14. Becker K, Keller B, von Eiff C, Brück M, Lubritz G, Etienne J, Peters G 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *App Environ Microbiol* 67: 5551-5557.
15. Bennett RW, Lancette GA 2001. *Staphylococcus aureus*. In *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual online*. Chapter 12. Available in <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Accessed on 14/02/2004
16. Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, De Ryck R, Hauser PM, Petignat C, Francioli P 2001. Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 39: 3442-3445.
17. Brasil 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado*. Anexo V.
18. Brasil 1996. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução MERCOSUL/GMC/RES, nº 145 de 13 de dezembro de 1996. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal.
19. Buzzola FR, Quelle L, Gomez MI, Catalano M, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Denamiel G, Sordelli DO 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol Infect* 126: 445-52.

20. Cardoso HFT, Silva N, Sena MJ, Carmo LS 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Lett Appl Microbiol* 29: 347-349.
21. Cardoso RCV 1999. Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes de pólo petroquímico de Camaçari. *Curso de especialização em controle de qualidade dos alimentos*, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
22. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos AA, Faria ME, Pena EC, Jett M, Heneine LG 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 19: 9-14.
23. Chambers HF 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7: 178-182.
24. Chiou CS, Wei HL, Yang LC 2000. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38: 2186-90.
25. Costa, EO, Benites NR, Guerra JL, Melville PA 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J Vet Med B* 47: 99-103.
26. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, Lencastre H 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and –resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9865-9870.
27. Curtis ML, Franceschi O, Castro N 2000. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos em comedores de empresas privadas. *Arc Latinoam Nutr* 50: 177-182.
28. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* 67: 1-17.
29. De Luca G, Zanetti F, Stampi S 1997. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. *Int J Food Microbiol* 35: 267-270.

30. De Oliveira AP, Watts JL, Salmon SA, Aarestrup FM 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci* 83: 855-862.
31. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34.
32. EMBRAPA 2005a. Brasil – produção, importação, exportação e consumo de leite. Disponível em: <http://www.cnpqi.embrapa.br>. Acesso em: 07/03/06.
33. EMBRAPA 2005b. Produção brasileira de queijo – (toneladas). Disponível em: <http://www.cnpqi.embrapa.br>. Acesso em: 07/03/06.
34. Essawi T, Na'was T, Hawwari A, Wadi S, Doudin A, Fattom AI 1998. Molecular, antibiogram and serological typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Al-Makased Hospital in East Jerusalem. *Trop Med Int Health* 3: 576-583.
35. Euzéby JP 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47: 590-592.
36. Figueroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Faúndez G 2002. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos em manipuladores de alimentos. *Rev Méd Chil* 130: 859-64.
37. Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect* 119: 261-269.
38. Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton C 1991. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* intramammary infections: the effect of milking time hygiene. *Cornell Vet* 81: 183-193.
39. Foxman B, Riley LW 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 153: 1135-1141.
40. Franco BDGM, Landgraf M 1996. *Microbiologia dos Alimentos*. Ed. Atheneu, São Paulo, 182 pp.
41. Fueyo JM, Martín MC, González-Hevia MA, Mendoza MC 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. *Int J Food Microbiol* 67: 139-145.

42. Garrido NS, Morais JMT, Briganti RC, Oliveira MA, Bergamini AMM, Oliveira SAV, Fávoro RMD 2001. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 60: 141-146.
43. Gialluly C, Loulergue J, Bruant G, Mereghetti L, Massuard S, van der Mee N, Audurier A, Quentin R 2003. Identification of new phages to type *Staphylococcus aureus* strains and comparison with a genotypic method. *J Hosp Infec* 55: 61-67.
44. Gilot P, van Leeuwen W 2004. Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 42: 1265-1269.
45. Goñi P, Vergara Y, Ruiz J, Vila J, Gómez-Lus R 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int J Antimicrob Agents* 23: 268-272.
46. Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ Pitt T 2002. Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. *J Clin Microbiol* 40: 4544-4546.
47. Gündoğan N, Citak S, Turan E 2005. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. *Food Control* 17: 389-392.
48. Hennekinne JA, Kerouanton A, Brisabois A, De Buyser ML 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol* 94: 321-329.
49. Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 35: 2514-2520.
50. Jablonski LM, Bohach GA 1997. *Staphylococcus aureus*. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds) *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, American Society for Microbiology, Washington, p. 353-375.

51. Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 8: 82-84.
52. Joo YS, Fox LK, Davis WC, Bohach GA, Park YH 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet Microbiol* 80: 131-138.
53. Jørgensen HJ, Mørk T, Caugant DA, Kearns A, Rørvik LM 2005a. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl Env Microbiol* 71: 8352-8361.
54. Jørgensen HJ, Mathisen T, Løvseth A, Omoe K, Qvale KS, Loncarevic S 2005b. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett* 252: 267-272.
55. Kapur V, Sisco WM, Greer RS, Whittam TS, Musser JM 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* 33: 376-380.
56. Khambatty FM, Bennett RW, Shah DB 1994. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* 113: 75-81.
57. Kloos WE, Bannerman TL 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology, Washington DC. p. 264-282.
58. Krug EEB 2006. Avaliação e perspectivas do mercado de leite para 2006. Disponível em <http://www.infoleche.com/www/contenido/comercializacion/> Acesso em: 04/03/2006.
59. Kumari DNP, Keer V, Hawkey PM, Parnell P, Joseph N, Richardson JF, Cookson B 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 35: 881-885.

60. Labarca J 2002. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev Chil Infectol* 19: S157-160.
61. Lancette GA, Tatini SR 1992. *Staphylococcus aureus*. In Vanderzant C, Splittstoesser DF *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. American Public Health Association (APHA), Washington DC. p.533-559
62. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* 67: 127-141.
63. Leigh JA 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J* 157: 225-238.
64. Le Loir Y, Baron F, Gautier M 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen Mol Res* 2: 63-76.
65. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95: 38-43.
66. Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S 1999. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283: 806-9.
67. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189: 2334-2336.
68. Linhardt F, Ziebuhr W, Meyer W, Hacker J 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* 95: 181-186.
69. Lipman LJA, de Nijs A, Lam TJGM, Rost JA, van Dijk L, Schukken YH, Gaastra W 1996. Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mammary glands of cows. *Vet Microbiol* 48: 51-55.

70. Loguercio AP, Aleixo JAG 2001. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural* 31: 1063-1067.
71. Loncarevic S, Jørgensen HJ, Løvseth A, Maticen T, Rørvik LM 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol* 98: 344-350.
72. Maciel CHP, Pinheiro MS, Vilas Boas GV 2002. Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em manipuladores de alimentos de uma indústria de linguiça do estado do Rio de Janeiro. *XVIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre-RS. p. 3240.
73. Marsou R, Idrissi L, BenHammida H, Zouhdi M, Boudouma M, Goldner M 2001. Relationship of Staphylococcal isolates in a Moroccan hospital by comparing phenotypical and genotypical tests. *Pathol Biol* 49: 109-14.
74. Martín MC, Fueyo JM, González-Hevia MA, Mendoza MC 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three poisoning outbreaks. *Int J Food Microbiol* 94: 279-86.
75. Mathews KR, Kumar SJ, O'Conner SA, Harmaon RJ, Pankey JW, Fox LK, Oliver SP 1994. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol Infect* 107: 177-185.
76. Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34: 2598-2600.
77. McCullagh JJ, McNamee PT, Smyth JA, Ball HJ 1998. The use of pulsed field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks. *Vet Microbiol* 63: 275-281.
78. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
79. Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl HP, Schafer T, Ring J, Vandenesch F, Abeck D 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 306-9.

80. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 40: 2119-2125.
81. Mørk T, Tollersrud T, Kvitle B, Jørgensen HJ, Waage S 2005. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine and caprine mastitis. *J Clin Microbiol* 43: 3979-3984.
82. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M, The Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 39: 3481-3485.
83. Nagase N, Shimizu A, Kawano J, Yamashita K, Yoshimura H, Ishimaru M, Kojima A 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. *J Vet Med Sci* 64: 1169-1172.
84. Nascimento JS, Santos KRN, Gentilini E, Sordelli D, Bastos MCF 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol* 85: 133-144.
85. Na'was T, Hawwari A, Hendrix E, Hebden J, Edelman R, Martin M, Campbell W, Naso R, Schwalbe R, Fattom AI 1998. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J Clin Microbiol* 36: 414-420.
86. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standards. M2-A8*. 8th ed. NCCLS, Wayne PA. 31p.
87. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bártoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 98: 73-79.
88. Olive DM, Bean P 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.

89. Oliveira AM, Gonçalves MO, Shinohara NKS, Stamford TLM 2003. Manipuladores de alimentos. Um fator de risco. *Hig Alimentar* 17: 12-19.
90. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM 2001. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis* 5: 163-170.
91. O'Mahony R, Abbott Y, Leonard FC, Markey BK, Quinn PJ, Pollock PJ, Fanning S, Rossney AS 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet Microbiol* 109: 285-196.
92. Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB 1997. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol* 35: 1260-1262.
93. Peacock SJ, Silva GDI, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG, Day NPJ 2002. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *J Clin Microbiol* 40: 3764-3770.
94. Pinto RG, Ornelas EA, Tomich TR, Pereira AJG 2001. Avaliação da higienização das mãos dos manipuladores em uma indústria de pão de queijo. *XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Foz do Iguaçu-PR. p. 416.
95. Rêgo JC, Guerra NB, Pires EF 1997. Influência do treinamento no controle higiênico-sanitário de unidades de alimentação e nutrição. *Rev Nutr PUCCAMP* 10: 50-62
96. Rivas A, Gonzalez RN, Wiedmann M, Bruce JJ, Cole EM, Bennett GJ, Schulte HF, Wilson DJ, Mohammed HO, Batt CA 1997. Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotypes recovered from New York dairy herds. *Am J Vet Res* 58: 482-487.
97. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci* 77: 3354-3364.
98. Rodgers JD, McCullagh JJ, McNamee T, Smyth JA, Ball HJ 1999. Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler

parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet Microbiol* 69: 189-198.

99. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, Benembarek PK 2004. A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: Evidence for risk management. *Public Health Rep* 119: 427-434.
100. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andreumont A 1993. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 31: 982-985.
101. Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol* 37: 1459-1463.
102. Senna JPM, Pinto CA, Carvalho LPS, Santos DS 2002. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 40: 2254-2256.
103. Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, Kawano J 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 38: 3746-3749.
104. Shimizu A, Kawano J, Yamamoto C, Kakutani O, Anzai T, Kamada M 1997a. Genetic analysis of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Med Sci* 59: 935-937.
105. Shimizu A, Kawano J, Yamamoto C, Kakutani O, Fujita M 1997b. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and phage typing for discriminating strains of *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res* 58: 1412-6.
106. Shopsin B, Kreiswirth BN 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7: 323-326.

107. Silva Jr. EA 2005. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos*, 6^a ed., Livraria Varela, São Paulo, 623p.
108. Silva PHF 1997. Leite. *Aspectos de composição e propriedades*. Disponível em <http://www.sbgensino.foco.fae.ufmg.br/> Acesso em 10/04/2006.
109. Singer RS, Sisco WM, Carpenter TE 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 42: 5502-5511.
110. Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet Microbiol* 96: 91-102.
111. Stephan R, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler C 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol* 78: 373-382.
112. Strandén A, Frei R, Widmer AF 2003. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? *J Clin Microbiol* 41: 3181-3186.
113. Su C, Kanevsky I, Jayarao BM, Sordillo LM 2000. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Vet Microbiol* 71: 53-58.
114. Su YC, Wong ACL 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J Food Prot* 60: 195-202.
115. Suzuki Y, Saito M, Ishikawa N 1999. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int J Food Microbiol* 46: 271-274.
116. Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering RV, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 32: 407-415.

117. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-39.
118. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439.
119. Tondo EC, Guimarães MC, Henriques JA, Ayub MA 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol* 46: 1108-14.
120. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY 1998. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiol* 15: 33-41.
121. Uemura E, Kakinohana S, Higa N, Toma C, Nakasone N 2004. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. *Jpn J Infect Dis* 57: 21-24.
122. van Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14: 547-560.
123. VandenBergh MFQ, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37: 3133-3140.
124. Vanderlinde PB, Fegan N, Mills L, Desmarchelier PM 1999. Use of pulse field gel electrophoresis for the epidemiological characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. *Int J Food Microbiol* 48: 81-85.
125. van Duijkeren E, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol* 103: 91-97.

126. Vautor E, Abadie J, Guibert M, Huard C, Pépin M 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 96: 69-79.
127. Vautor E, Abadie J, Guibert M, Chevalier NC, Pépin M 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Vet Microbiol* 106: 235-239.
128. Villard L, Lamprell H, Borges E, Maurin F, Noel Y, Beuvier E, Chamba JF, Kodjo A 2005. Enterotoxin D producing strains of *Staphylococcus aureus* are typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Food Microbiol* 22: 261-265.
129. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE 2003a. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol* 95: 133-147.
130. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE 2003b. Phage types and antimicrobial resistance among Danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. *Vet Microbiol* 97: 63-72.
131. Vivoni AM, Moreira BM 2005. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 693-698.
132. Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 38: 1931-1939.
133. Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking, equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol* 40: 3894-3902.
134. Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lämmle C 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 108: 243-249.

ARTIGO 1

Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Manipuladores, Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil

Este artigo foi enviado e aceito para publicação pelo Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (Anexo 1).

Utilização do Antibiógrama como Ferramenta de Tipificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus*

Isolados de Manipuladores, Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil

Antibiogram as Instrument of Phenotypic Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Personnel, Raw

Milk and Minas Frescal Cheese in a Dairy Plant of Goiás, Brazil

Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André^{*1}, Patrícia Pimentel Santos¹, Maria Raquel Hidalgo Campos²,
Liana Jayme Borges², Álvaro Bisol Serafini¹

Instituições:

1-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

2-Faculdade de Nutrição/UFG.

Endereço completo*:

Rua 01, nº 967, aptº 1301, Ed. Ilhas Christmas, Setor Oeste, Goiânia, Goiás, CEP: 74115-040. Fone/Fax:

(0xx62) 215-8840. e-mail: mcdantas@brturbo.com.br

Utilização do Antibiógrama como Ferramenta de Tipificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus*

Isolados de Manipuladores, Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil

1. Introdução

Os produtos lácteos são freqüentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares em todo o mundo. Muitos microrganismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados, entre eles a bactéria *Staphylococcus aureus*^{6,14,26}.

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. A contaminação de alimentos com *S. aureus* deve-se primariamente à sua presença na matéria-prima¹⁴, apesar de um grande número de surtos de toxinfecções alimentares envolverem cepas de origem humana como fontes de contaminação³⁵. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e sua presença em manipuladores assintomáticos está bem documentada^{5,31,30,32,33,18,16,2,9} e contribui para a contaminação de produtos lácteos. Os *S. aureus* são considerados os mais importantes na epidemiologia das mastites em vacas de leite e o patógeno mais abundante em leite cru^{1,15,4,36,23}. A mastite bovina é uma doença epidêmica de difícil tratamento e controle, sendo a causa mais freqüente do uso de antimicrobianos em propriedades leiteiras^{36,17}. O uso indiscriminado de antibióticos em alimentos, seja para fins terapêuticos, profilaticamente, ou ainda, incorporados à alimentação como suplemento dietético, facilita a disseminação de microrganismos designados MDR (multidroga resistentes). Entre os problemas ocasionados por estes resíduos, destaca-se a seleção de cepas resistentes, como também, a possibilidade de transferência de resistência entre espécies, através de mecanismos genéticos²⁹.

Sob condições favoráveis, estas bactérias podem proliferar e constituir risco à Saúde Pública pela sua capacidade de produzir enterotoxinas. A ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas é responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica, que é uma das doenças de origem alimentar mais comuns em vários países do mundo^{10,14}.

O queijo Minas Frescal é um queijo mole, de alta umidade, consumido fresco⁷. Fatores que influenciam a qualidade do queijo são: a contaminação da matéria-prima (leite) e demais ingredientes, a contaminação a partir de manipuladores, equipamentos e após o processamento industrial e o tempo de exposição a temperaturas que favoreçam a proliferação de microrganismos²⁴.

A tipificação de *S. aureus* tem sido usada para sugerir a origem desta bactéria em alimentos^{33,37,35}. O antibiógrama tem sido um método útil de tipificação bacteriana, contribuindo na investigação de fontes de contaminação, sendo a técnica amplamente disponível e padronizada e podendo ser utilizada com várias espécies

microbianas⁸. Sua principal desvantagem consiste na variabilidade da expressão da resistência, a instabilidade devido à transmissão horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos²⁵.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente, isolados de *S. aureus* obtidos de queijo Minas Frescal, leite cru e manipuladores de um laticínio, utilizando o antibiograma e determinar a similaridade, se presente, entre os isolados do queijo e suas possíveis fontes de contaminação.

2. Material e Métodos

No período de Março de 2004 a Fevereiro de 2005 foram coletadas 140 amostras em um laticínio, no estado de Goiás: 24 amostras de leite cru, 24 de queijo ($\pm$ 500g) e 46 amostras de mãos e 46 de nariz a partir de quatro manipuladores, funcionários da área de processamento de queijo. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e de Ambientes da Universidade Federal de Goiás.

A contagem de *S. aureus* para as amostras de leite cru e queijo Minas frescal foi realizada no Ágar Baird-Parker²² e o isolamento de nasofaringe e mãos, após os suabes terem sido previamente inoculados em BHI, foi a partir do ágar Manitol Salgado³². Para a identificação utilizou-se: Coloração de Gram, produção de catalase, coagulase, termonuclease e acetoina (VP), fermentação anaeróbica da glicose e manitol^{22,19}. A tipificação fenotípica foi realizada por antibiograma, através da técnica de difusão em placas²⁷. Foram testados os seguintes discos de antimicrobianos: eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina. Uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi usada como controle.

3. Resultados e Discussão

Das 140 amostras de leite cru, queijo Minas Frescal e manipuladores coletadas, 66 (47,1%) foram positivas para *Staphylococcus aureus* e destas foram obtidos 77 isolados (Tab. 1).

Dos quatro manipuladores, três (75%) apresentaram-se contaminados pelo menos duas vezes nas mãos e/ou nariz durante todo o período da coleta. Das 92 amostras coletadas neste período, 31 (33,7%) foram positivas para *S. aureus* sendo 16 (34,8%) isolados obtidos a partir de 46 suabes de nasofaringe e 15 (32,6%) isolados a partir de suabes de mãos (Tab. 1). As amostras foram coletadas em dias diferentes e os isolados foram comparados através do antibiograma. Esses resultados mostram porcentagens de contaminação superiores aos obtidos em outros países.

No Kuwait, 26,6% dos trabalhadores de um restaurante portavam *S. aureus* na nasofaringe⁵; no Chile, 65,5% dos manipuladores de alimentos apresentaram a bactéria na nasofaringe, orofaringe, mãos e unhas³¹. Na Turquia, 70% dos manipuladores estavam com as mãos contaminadas⁹. No Brasil, estudos demonstram a presença da bactéria em manipuladores em Teresina, PI, com prevalência variando de 43,3% a 49,5%³⁰; em

Porto Alegre, RS, de 30% a 35,2%^{2,33}. O homem é considerado portador de *S. aureus* na nasofaringe em 37,2% da população em geral²¹.

Das 24 amostras de leite cru coletadas, 18 (75,0%) apresentaram *S. aureus*, produzindo 26 isolados. Resultados elevados também foram encontrados em Trinidad³, onde 97,6% das amostras apresentavam *S. aureus*. A média de contagem no leite cru foi de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL (Tab. 1). Isto assume grande importância em Saúde Pública, considerando que as enterotoxinas podem ser detectadas com inóculos de 10^3 UFC/g¹⁰. *S. aureus* é a bactéria mais freqüentemente isolada de mastite bovina em todo o mundo^{4,12} e aproximadamente em 20% das amostras de leite de vacas com mastite no Brasil²³. Considerando que o leite foi coletado no tanque de recepção e demonstrou altas contagens, cepas patogênicas podem disseminar para o consumidor a partir da fabricação de derivados do leite, principalmente se este não sofrer processamento adequado.

Tabela 1. Contaminação de *S. aureus* em manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal em um laticínio de Goiás, Brasil.

Fontes (Nº. de amostras coletadas)		Amostras positivas Nº. (%)		Nº isolados		Média (contagens mínimas e máximas) UFC/ml ou g
Manipuladores (92)	Nariz (46)	31 (33,7)	16 (34,8)	31	16	ND
	Mãos (46)		15 (32,6)		15	ND
Leite cru (24)		18 (75,0)		26		$1,1 \times 10^5$ ($<1,0 \times 10^1$ a $7,5 \times 10^5$)
Queijo(24)		17 (70,8)		20		$3,8 \times 10^4$ ($<1,0 \times 10^1$ a $3,4 \times 10^5$)
Total (140)		66 (47,1)		77		-

*ND: não determinado.

Cepas de *S. aureus* foram encontradas em 17 (70,8%) das 24 amostras de queijo Minas Frescal coletadas, obtendo-se 20 isolados. A contagem da bactéria variou de $<1,0 \times 10^1$ a $3,4 \times 10^5$, com média de $3,8 \times 10^4$ UFC/g (Tab. 1). Treze amostras (54,2%) estavam acima do limite (10^3 UFC/g) estabelecido pela legislação vigente no Brasil¹¹. Na França, um estudo durante o período de 1988 a 1997 demonstrou que o leite e derivados foram responsáveis por 59% dos surtos de toxinfecção alimentar e que o *S. aureus* foi o patógeno mais freqüentemente associado a surtos devidos ao consumo de queijos fabricados a partir de leite cru ou desconhecido¹⁴. No Brasil estudos demonstram uma porcentagem maior de contaminação do queijo. Em Blumenau, SC, 95% das amostras de queijo continham *S. aureus*²⁸, em Poços de Caldas, MG, 50% das amostras, com contagens de 10^5 UFC/g em média⁶. Em Cuiabá, MT, 96,7% das amostras de queijo estavam fora dos padrões microbiológicos nacionais²⁴ e no Rio de Janeiro, RJ, 77% das amostras estavam contaminadas e 17,7% delas com contagens acima do limite estabelecido⁷.

Dos 77 isolados, 53 (68,8%) foram resistentes à penicilina, 19 (24,7%) à tetraciclina, cinco (6,5%) resistentes à eritromicina, quatro (5,2%) à oxacilina e um (1,3%) à vancomicina (Tab. 2). Onze (14,3%) isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados. Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina e gentamicina. Resultado semelhante foi encontrado em manipuladores no Rio Grande do Sul onde todos os isolados foram sensíveis a gentamicina².

A resistência à penicilina foi a de maior frequência e foi de 74,2% entre os isolados obtidos dos manipuladores, 69,2% para os de leite cru e 68,8% entre os obtidos a partir do queijo Minas Frescal. Resultados semelhantes para manipuladores (70,0%) foram encontrados por Acco *et al.*². No Chile, 100% das cepas isoladas de manipuladores foram resistentes à penicilina¹⁶. Em Porto Alegre, RS, 94,4% das amostras obtidas dos manipuladores, 47,3% do leite cru e 50% do produto final foram resistentes à penicilina³³. Lange *et al.* (1999)²³ observaram 43,9% de *S. aureus* isolados de leite cru resistentes à penicilina no Brasil e Calvinho *et al* (2002)¹³, em 47.6% deste produto, na Argentina.

A utilização do antibiograma permitiu a observação de 18 (23,4%) dos isolados, resistentes a mais de um antibiótico. Atualmente grande importância tem sido dada à multi-resistência antibiótica das bactérias, por sua correlação com virulência como os *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA)²¹. Neste estudo, quatro (5,2%) isolados (três dos manipuladores e um de queijo) apresentaram padrão de MRSA. A disseminação de microrganismos resistentes, entre eles MRSA por alimentos e/ou manipuladores de alimentos deve ser considerada preocupante e evitada na cadeia de produção.

Tabela 2. Susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal em um laticínio de Goiás, Brasil.

Amostras Positivas	Nº. de isolados	Resistência a N° (%)						
		ERI	CIP	TET	GEN	VAN	OXA	PEN
Manipuladores (31)	31	2 (6,4)	0 (0)	5 (16,1)	0 (0)	1 (3,2)	3 (9,7)	23 (74,2)
Leite cru (18)	26	2 (7,7)	0 (0)	9 (34,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (69,2)
Queijo (17)	20	1 (5,0)	0 (0)	5 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (5,0)	12 (60,0)
Total (66)	77	5 (6,5)	0 (0)	19 (24,7)	0 (0)	1 (1,3)	4 (5,2)	53 (68,8)

ERI-eritromicina, CIP-ciprofloxacina, TET-tetraciclina, GEN-gentamicina, VAN-vancomicina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina.

De acordo com os padrões de susceptibilidade originados pelo antibiograma, foi possível classificar os 77 isolados em doze perfis diferentes (A – L), como mostrado na Tab. 3. Os *S. aureus* isolados de manipuladores foram classificados em nove diferentes perfis (A, B, C, D, F, I, J, K e L), enquanto o leite cru em oito perfis (A, B, C, D, E, F, H e I) e os isolados de queijo em oito perfis diferentes (A, B, C, D, E, F, G, e J), sugerindo

diferentes origens de contaminação do produto final. De acordo com a Tab. 3, houve predominância de isolados com fenótipos A, B, C e D. Ainda na Tab. 3, verifica-se que das 20 cepas de *S. aureus* obtidas a partir do queijo, cinco (25%) possuem o fenótipo C.

Nossos resultados mostraram cepas indistinguíveis pelo antibiograma, colonizando manipuladores, leite e queijo, não permitindo a identificação da fonte destas bactérias para o produto final. Somente as amostras 3Q (perfil E) e 2Q (perfil J) apresentaram perfis correspondentes a somente uma das fontes prováveis, leite (13L, 14L') e manipulador (16M1), respectivamente.

Nos últimos anos, vários métodos de tipificação bacteriana têm sido usados para comparar cepas e identificar mecanismos de transmissão e fontes de contaminação para várias bactérias patogênicas³⁷. Entre esses métodos, o antibiograma tem sido usado por ser de fácil execução, acessível, permitir controle de qualidade rigoroso e de baixo custo⁸. Além disso, permite o conhecimento acerca da resistência microbiana das bactérias testadas. Entretanto, o antibiograma apresenta limitações, como baixa sensibilidade, o que pode levar à determinação de pontos de controle inadequados ou identificação equivocada de fontes de contaminação^{33,1}.

Tabela 3. Perfis de susceptibilidade antimicrobiana originados de cepas de *S. aureus* isoladas de um laticínio de Goiás, Brasil.

Número da amostra e origem ^a	Perfil de susceptibilidade ^b	Fenótipo
2,4M4, 11M1, 12M2, 8L, 17L, 18L, 5Q, 5Q', 19Q, 22Q	SSSSSSS	A
6M2, 4N4, 10M4, 12M1, 5L, 14L, 16L, 15Q, 18Q, 21Q	ISSSSSS	B
8,12,14,20N4, 8M4, 13,15M1, 9L', 10L', 12L, 12L', 17L', 19L', 20L, 20L', 22L, 4Q', 7Q, 8Q, 16Q', 23Q	SSSSSSR	C
1N2, 3,5,7,10,15,17N4, 15M4, 6,16N1, 13L', 16L', 6Q, 18Q'	ISSSSSR	D
13L, 14L', 3Q	ISRSSSS	E
5M4, 19N2, 6L, 6L', 11L, 4Q, 10Q, 24Q	SSRSSSR	F
13Q	RSSSSSR	G
11L', 24L	ISRSSSR	H
10N2, 4L, 15L'	RSRSSSR	I
16M1, 2Q	ISRSSRR	J
1M1	RSSRRRR	K
19M2	ISRISRR	L

^a M – Mão; N – Nariz; L – Leite; Q – Queijo.

^b Resistência (R), Susceptibilidade intermediária (I) e Susceptibilidade (S). Os antibióticos estão organizados na sequência: eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina.

O elevado percentual de amostras de queijo Minas Frescal apresentando *S. aureus*, inclusive com contagens superiores à permitida pela legislação brasileira é bastante preocupante, pelo risco potencial de

produção de enterotoxinas e conseqüente intoxicação alimentar. Além disso, cepas de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos estão presentes em todas as fontes testadas e portanto, comprometendo a segurança da cadeia de produção do queijo, representando risco ao consumidor, inclusive com detecção de MRSA. Apesar de não ter sido eficiente em proceder a tipificação das cepas isoladas, o antibiograma forneceu informações importantes quanto à susceptibilidade das cepas e quanto ao perigo potencial de disseminação de cepas resistentes. Mais uma vez evidenciam-se falhas na produção deste alimento que continua sendo ainda um produto de baixa qualidade microbiológica, prejudicando a indústria nacional.

4. Referências Bibliográficas

1. AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v.45, p.139, 1995.
2. ACCO, M.; FERREIRA, F.; HENRIQUES, J.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, p.489-493, 2003.
3. ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolates from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v.61, p.629-632, 1998.
4. AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.959-964, 2001.
5. AL BUSTAN, M.A.; UDO, E.E.; CHUGH, T.D. Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait City. **Epidemiology and Infection**, v.116, n.3, p.319-22, 1996.
6. ALMEIDA FILHO, E.S. & NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, p.578-80, 2000.
7. ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.6, p.1172-7, 2002.
8. ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999. p.116-137.

9. AYCIÇEK, H.; AYDOGAN, H.; KÜÇÜKKARAASLAN, A.; BAYSALLAR, M.; BASUSTAOGLU, A. Assesment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. **Food Control**, v.15, p.253-259, 2004.
10. BALABAN, N. & RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.1-10, 2000.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 – DOU de 10/01/2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**, 2001.
12. BUZZOLA, F.R.; QUELLE, L.; GOMEZ, M.I.; CATALANO, M.; STEELE-MOORE, L.; BERG, D.; GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; SORDELLI, D.O. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. **Epidemiology and Infection**, v.126, p.445-452, 2001.
13. CALVINHO, L.F.; TOSELLI, F.; WEIMANN, W.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; IGUZQUIZA, I.A. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy cathment area of Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.34, n.3, p.171-175, 2002.
14. DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.1-17, 2001.
15. DE OLIVEIRA, A.P.; WATTS, J.L.; SALMON, S.A.; AARESTRUP, F.M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.855-862, 2000.
16. FIGUEROA, G.G.; NAVARRETE, P.W.; CARO, M.C.; TRONCOSO, M.H.; FAÚNDEZ, G. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Revista Médica de Chile**, v.130, n.8, p.859-864, 2002.
17. GOÑI, P.; VERGARA, Y.; RUIZ, J.; VILA, J.; GÓMEZ-LUS, R. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, n.3, p.268-272, 2004.
18. HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J.; ASPLUND, K.; MÄKI-PETÄYS. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, v.63, n.11, p.1487-1491, 2004.

19. KLOOS, W.E. & BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999. p.264-282.
20. KLUYTMANS, J.; BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.505-20, 1997.
21. KUMARI, D.N.; KEER, V.; HAWKEY, P.M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.881-885, 1997.
22. LANCETTE, G.A. & TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. p.533-559.
23. LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.67, p.127-141, 1999.
24. LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.
25. MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.2119-2125, 2002.
26. NAGASE, N.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; YAMASHITA, K.; YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.12, p.1169-1172, 2002.
27. NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standards. M2-A8**. 8thed. Wayne, PA: NCCLS, 2003. 31p.
28. REIBNITZ, M.G.; TAVARES, L.B.; GARCIA, J.A. Presence of fecal coliforms, *Escherichia coli* and DNase- and coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, in "colonial" cheese sold in the city of Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brazil. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

29. SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. & NADER FILHO, A.N. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos sobre alguns agentes bacterianos de mastite bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39, n.233, p.7-12, 1984.
30. SOARES, M.J.S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N.H.; NOLETO, A.L.S.; FIGUEIREDO, A.M.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, v.46, p.214-221, 1997.
31. SOTO, A.; SALDIAS, M.E.; OVIEDO, P. FERNANDEZ, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* among food handlers from a metropolitan university in Chile. **Revista Médica de Chile**, v.124, n.9, p.1142-6, 1996.
32. SUZUKI, Y.; SAITO, M.; ISHIKAWA, N. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.271-274, 1999.
33. TONDO, E.C.; GUIMARÃES, M.C.; HENRIQUES, J.A.; AYUB, M.A. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1108-1114, 2000.
34. VANDENBERGH, M.F.Q.; YZERMAN, E.P.F.; VAN BELKUM, A.; BOELEN, H.A.M.; SIJMONS, M.; VERBRUGH, H.A. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3133-3140, 1999.
35. VAUTOR, E.; ABADIE, J.; GUIBERT, M.; HUARD, C.; PÉPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v.96, n.1, p.69-79, 2003.
36. VINTOV, J., AARESTRUP, F.M., ZINN, C.E. AND OLSEN, J.E. Phage types and antimicrobial resistance among Danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. **Veterinary Microbiology**, v.97, n.1-2, p.63-72, 2003.
37. ZADOKS, R.N.; VAN LEEUWEN, W.B.; KREFT, D.; FOX, L.K.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking, equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.11, p.3894-3902, 2002.

Resumo

O trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar fenotipicamente utilizando o antibiograma, *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal, em um laticínio de Goiás. Durante doze meses (Março/2004 a Fevereiro/2005) 140 amostras foram analisadas. As cepas foram isoladas de 75% dos manipuladores resultando em 31 (33,7%) isolados a partir de 92 amostras coletadas (46 de mãos e 46 de nasofaringe). Das 24 amostras de leite cru, 18 (75,0%) foram positivas, resultando em 26 isolados, com média de contagem de $1,1 \times 10^5$ UFC/ml. Das 24 amostras de queijo 17 (70,8%) foram positivas originando 20 isolados, com média de $3,8 \times 10^4$ UFC/g, sendo 13 (54,2%) com população acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (10^3 UFC/g). A tipificação das cepas foi feita pelo antibiograma, através do método de difusão em placas. Todos os isolados foram susceptíveis à ciprofloxacina e gentamicina. Foi observada resistência em cinco (6,5%) isolados para eritromicina, 19 (24,7%) para tetraciclina, um (1,3%) para vancomicina, quatro (5,2%) para oxacilina e 53 (68,8%) para penicilina. Onze (14,3%) isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados e 18 (23,4%) foram resistentes a mais de um antibiótico. O antibiograma permitiu a classificação das cepas em doze perfis diferentes (A-L), porém não foi uma técnica eficiente em determinar a origem da contaminação final do queijo.

Palavras-chave: Queijo, Manipuladores, Susceptibilidade antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*.

Summary

During a year (March/2004 to February/2005) 140 samples of raw milk, dairy staff, and Minas Frescal cheese were analyzed for the presence of *S. aureus* in a dairy plant in Goiás, Brazil. Strains were isolated from 75% of the personnel investigated resulting in 31 (33.7%) isolates from 92 collected samples (46 from hands and 46 from nasopharynx). The 24 raw milk samples resulted in 18 (75.0%) positive samples and 26 isolates, with mean number: 1.1×10^5 CFU/ml. Among 24 cheese samples 17 (70.8%) were positive resulting in 20 isolates, with mean number: 3.8×10^4 CFU/g. Thirteen samples (54.2%) were above the limit established by the Brazilian legislation (10^3 CFU/g). The differentiation of strains was performed by antimicrobial susceptibility test. All isolates were susceptible to ciprofloxacin and gentamicin. Resistance was observed in five (6.5%) isolates for erythromycin, 19 (24.7%) for tetracycline, one (1.3%) for vancomycin, four (5.2%) for oxacillin and 53 (68.8%) isolates for penicillin. Eleven isolates (14.3%) were susceptible to all antibiotics tested and 18 (23.4%) were resistant to more than one antibiotic. The antibiotic susceptibility allowed the discrimination of isolates in 12 different profiles (A-L), but the phenotypic typing failed to determine the source of bacteria for the cheese.

Key-words: Cheese, Personnel, Antibiotic susceptibility, *Staphylococcus aureus*.

ARTIGO 2

Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by pulsed-field gel electrophoresis

Este artigo foi enviado para publicação ao Journal of Applied Microbiology (Anexo 2)

Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by pulsed-field gel electrophoresis

M.C.D.P.B. André, M.R.H. Campos, L.J. Borges, A. Kipnis, F.C. Pimenta and A.B. Serafini

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil.

Running title: “*S. aureus* in a soft cheese plant”

Correspondence to Maria Cláudia D.P.B. André. Rua 01, nº 967, aptº 1301, Ed. Ilhas Christmas, Setor Oeste. CEP: 74115-040, Goiânia, GO, Brasil. (E-mail: mcdantas@brturbo.com.br), phone: 55 62 3215-8840, fax number: 55 62 3521-1838.

ABSTRACT

Aims: To compare the PFGE banding patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese produced in a dairy plant of Goiás, Brazil.

Methods and Results: Strains of *Staphylococcus aureus* isolated from personnel (n=29), raw milk (n=24), and Minas Frescal cheese (n=20) were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Sma*I. Two of 73 isolates were not typed by this method. Strains were compared to access the role of personnel and raw milk in the cheeses contamination. The results showed high diversity among the strains, since the 71 isolates typed generated 47 different DNA banding profiles, demonstrating a lack of predominance of an endemic clone in the dairy plant.

Conclusions: Four of 20 *S. aureus* isolated from cheeses were identical or closely related to 10 strains isolated from raw milk, and also to two strains isolated from food handlers' hands, suggesting the raw milk as the most probable source of *S. aureus* contamination in cheeses. No strain isolated from the nose was related to cheeses or milk strains.

Significance and Impact of the Study: This paper highlights the usefulness of PFGE as an epidemiological tool for determining the source of staphylococcal contamination in the food industry.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, pulsotypes, Minas Frescal cheese, raw milk, food handlers.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is recognized worldwide as the most important pathogen causing intramammary infections in dairy cows (Aarestrup et al. 1995; Nascimento et al. 2002; Vintov et al. 2003). In humans, *S. aureus* is an important cause of community-acquired as well as nosocomial morbidity and mortality. Recently, the increasing prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains has become an additional infection control problem in human and veterinary medicine (Kwon et al 2005; O'Mahony et al. 2005; Wylie et al 2005).

The major habitats of *S. aureus* include the nasal membranes (anterior nares, nasopharynx), skin and to a somewhat lesser extent the perineum, gastrointestinal and genital tracts of warm blooded animals (Kloos and Schleifer 1986). Nasal carriage is a recognized risk factor for *S. aureus* spread including to the foodstuffs (Kluytmans et al. 1997). The presence of *S. aureus* in food is often related to improper manipulation by personnel (Hatakka et al. 2000).

S. aureus is one of the most frequent bacteria isolated from Brazilian raw milk and bovine mastitis (Lange et al. 1999). Human handlers, milking equipment, the environment, and the udder and teat skin of dairy animals are possible sources of bulk milk contamination. Several outbreaks have been linked to raw milk (Kluytmans et al. 1997; De Buyser et al. 2001; Gündoğan et al. 2006).

Milk and their products are widely consumed in Brazil and Minas Frescal cheese, a kind of soft white Brazilian cheese, has been associated with staphylococcal food poisoning (SFP) (Carmo et al. 2002). Several factors, such as pH, initial population of *S. aureus*, and storage temperature, play important roles in the production of enterotoxins during cheese manufacture and industrialized dairy products can be sources of food poisoning (De Buyser et al. 2001), since SE is not inactivated by pasteurization and can

remain active in food for long periods of time (Manie et al. 1999; Balaban and Rasooly 2000).

Staphylococcal strains may vary considerably in virulence and epidemiological potential. To control the spread of staphylococcal infections, sources of contamination and mechanisms of transmission must be identified (Zadoks et al. 2000). The genetic heterogeneity in natural populations of *S. aureus* should be explored to trace the *S. aureus* spread in human, animal and contaminated food (Tenover et al. 1994; Kapur et al. 1995; Lange et al. 1999). To investigate the DNA heterogeneity, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is the recommended method for epidemiological typing of *S. aureus* isolated from human and bovine sources (Zadoks et al 2000, 2002; Jørgensen et al 2005).

The aims of our study were to isolate *S. aureus* from raw milk, the human nose and hands, and cheese in a dairy processing plant; determine their genetic patterns; and investigate any relationship among the strains, by the means of PFGE, in order to investigate possible sources of cheese contamination.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

A total of 140 samples, 24 from raw milk, 24 from Minas Frescal cheese, 46 from food handlers' anterior nares and 46 from their hands, were analyzed for the presence of *S. aureus* in a small dairy plant in Goiás State, Brazil, from March/2004 to February/2005. The industry was visited twice a month. The dairy plant had four workers handling milk and/or cheese and they were invited to participate. The study protocol was approved by the Ethical Committee from the Federal University of Goiás; and the participants gave informed consent. The hands and anterior nares samples were collected during each visit, from the handlers that were working on that day. Worker n^o 1 was

sampled 16 times; n° 2, 17 times; n° 3 just once and n° 4 was sampled 12 times. The hands and anterior nares were sampled by rubbing a sterile cotton swab around the inside of nostrils and applying an even pressure and rotating the swab without interruption (VandenBergh et al. 1999). The swabs were immediately placed in Brain Heart Infusion (BHI) broth. The raw milk and cheese were sampled following methodology described by Bennett and Lancette (2001). All collected samples were transported in an isothermal box with ice to the Food Control Laboratory of the Goiás Federal University and immediately analyzed.

Microbiological procedures

The milk and cheese samples were cultured on Baird Parker agar according to Bennett and Lancette (2001). The hand and anterior nare swabs seeded in BHI broth were incubated at 37°C for 24 h, streaked on mannitol salt agar medium and incubated at 37°C for 24 to 48 h (Kloos and Bannerman 1999). Based on colony morphology, Gram staining, production of acetoin, coagulase, catalase, heat stable DNase and anaerobic utilization of mannitol and glucose, the suspected colonies were identified as *S. aureus* (Bennett and Lancette 2001). When appropriate, more than one morphologically different colony was obtained from the same sample. The isolates were stored at -20°C in tripticase soy broth (TSB) with 20% glycerol awaiting further analyses.

Pulsed-field gel electrophoresis

The genetic pattern of *S. aureus* isolates was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of digested DNA, using a CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the method of Mulvey et al. (2001) with modifications. Briefly, a single isolated colony was inoculated in 3 mL of BHI broth and incubated at 37°C for 16-18 h. Five hundred microliters of the overnight culture were pelleted at 18000 *g* in a microcentrifuge for 1 min. Each pellet was resuspended in 150 µL of cell

suspension buffer (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.2, 20 mmol l⁻¹ NaCl, 50 mmol l⁻¹ EDTA) and mixed with 7 µL of lysostaphin (1 mg.mL⁻¹) and with 150 µL of 2% low-melting-point agarose. This mixture was dispensed into two plug molds and left to solidify. The plugs were transferred to 1 mL of lysis buffer (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.2, 50 mmol l⁻¹ NaCl, 50 mmol l⁻¹ EDTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% Sarkosyl) for 1 h at 37°C, followed by incubation at 50°C for 0.5 h in 1 mL of proteinase K (PK) buffer (250 mmol l⁻¹ EDTA, pH 9.0, 1% sarkosyl) and PK (60U.mL⁻¹). Plugs were rinsed once with 1.4 mL of wash buffer (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mmol l⁻¹ EDTA) and then washed three additional times with the same buffer for 30 min each. Approximately 1/3 of each plug was used for DNA digestion. Plugs were stabilized in 300 µL of 1X restriction enzyme buffer (REB) for 10 min at room temperature. REB was removed and 150 µL of 1X REB with 20 U of *Sma*I restriction enzyme was added, and the solution incubated for 4 h at 25°C. Digests of DNA were separated for 18 h by PFGE using 1% PFGE agarose in 120 mL of 0.5X TBE buffer (10X TBE = 0.89 mol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.4, 0.89 mol l⁻¹ boric acid, 0.02 mol l⁻¹ EDTA) in the following conditions: 14°C, 6 V.cm⁻¹, 5.3-34.9 pulse times, with a CHEF DR-II. A lambda ladder molecular weight marker (Bio-Rad) was included in each gel. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg.L⁻¹) and then photographed under UV light.

Isolates of *S. aureus* were placed in groups of identical or related strains by comparing the banding patterns produced, using a combination of photographic visual inspection and computer analysis (BioNumerics, v. 4.0; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A pulsotype (PT) was defined as a unique electrophoretic banding pattern. Isolates with identical restriction profiles were assigned as the same type and identified with a capital letter. PTs with one to three differences were considered closely related and were assigned as subtypes (ST) indicated with a numeral suffix. Isolates with more than three differences

were considered to be different types (Tenover et al. 1995; Zadoks et al., 2002).

Furthermore, the comparison between isolates from different gel runs was strengthened by including, in each gel, an isolate whose PFGE pattern had previously been determined. The coefficients of pairwise similarity were calculated using Dice formula, and dendrograms were created using unweighted-pair group method (UPGMA) using arithmetic averages. The cluster cutoff was set at 80% similarity and all clusters were identified by arabic numerals.

RESULTS

Seventy-three *S. aureus* isolates were obtained from workers, milk and cheese samples from the dairy plant (Table 1). The *S. aureus* were isolated from three (75%) of the food handlers investigated. The samples were collected, during each visit to the industry, from the handlers that were working on that day. A total of 92 samples, 46 from noses and 46 from hands, were collected from the three workers and *S. aureus* were recovered from 15 (32.6%) and 14 (30.4%) of those samples, respectively (Table 1). On seven occasions (5 times from worker n° 4 and once from workers n° 1 and n° 2), *S. aureus* was recovered from both hand and nose samples at the same time and the isolates in the same individual turned out to contain different clones.

Staphylococcus aureus was recovered from 16 (66.7%) and 17 (70.8%) of the 24 raw milk and 24 cheeses samples investigated, resulting in 24 and 20 isolates respectively (Table 1).

The 73 *S. aureus* strains were typed using PFGE. Two isolates (one from milk and one from cheese samples), after three repetitions, were not typeable by this method. The genetic analysis revealed 47 different DNA banding patterns varying from 7 to 14 distinct bands in the range from 679 kb to 48.5 kb, showing high genetic diversity among the

samples. A dendrogram that included all patterns was constructed on the basis of the similarity levels (Fig. 1). A cut-off point of 80% was considered to define 35 clusters, numbered from 1 to 35. The 71 *S. aureus* isolates typed were assigned to 34 different pulsotypes (PTs) and 13 subtypes.

In general food handlers presented multiple strains of *S. aureus* in nares and hands as demonstrated by the 20 different profiles obtained among the 29 isolates typed, showing a lack of an endemic strain. Otherwise, the results revealed that the handler number 4 harboured the same strain over a year in the nose and hands simultaneously.

The dominant cluster (27) included PT Z, subtype Z1 comprehending 12 isolates from milk and cheese samples. The second largest cluster (8) included PT H and subtype H1 comprehending six isolates from one hand (ST H1) and from five noses (PT H) of the same person. Twenty-one clusters and PT were represented by one isolate. The 19 cheeses isolates were assigned to 12 PT and to six ST (Fig. 1).

DISCUSSION

The aim of this study was to compare *S. aureus* isolates from food handlers' hands and noses, raw bovine milk and cheeses produced in a dairy plant, in order to establish a possible source of cheeses contamination, by means of PFGE typing.

The comparisons of the PFGE patterns allowed us to establish relationship among strains isolated from milk with 21.0% (4/19) of *S. aureus* isolated from cheeses (Table 2). According to the criteria established by Tenover et al. (1995), these isolates were considered identical or closely related (PT L and Z and subtypes L1 and Z1). Only cluster number 12 included strains from hands, milk and cheese (PT L and subtype L1). Two PTs showed identical strains from hands and milk (PT I and PT L) and additionally, close relationship was observed among strains of these sources (PT AC and AH and subtypes AC

1 and AH 1) (Fig. 1). Since that in this industry all cheeses were produced with raw milk and were hand-manufactured, the possibility of a cross-contamination between food handlers' hands and raw milk can not be ignored.

PFGE genotyping also showed that *S. aureus* isolates from raw milk presented some similarity to each other, since 23 isolates were assigned to nine PTs and four subtypes (Fig. 1). Tondo et al. (2000), analysing 19 raw milk strains obtained in a dairy plant in the south of Brazil, found all strains unrelated.

The cheeses presented more diversity of strains, since 19 strains typed were assigned to 12 PTs and six subtypes suggesting different origins of contaminations (Table 2). This result is similar to that obtained by Tondo et al. (2000), which found a great diversity among strains obtained from ten products by milk analysed in a dairy plant in Brazil.

The percentage of workers carrying *S. aureus* (75%) in this industry is higher than in the general population (37.2%) (Kluytmans et al. 1997), but the low number of workers in our study (4) did not allow us to come to a firm conclusion. The anterior nares are considered as the primary reservoir of *S. aureus* in humans (Kluytmans et al. 1997) and could represent a site for contamination of cheese. Nevertheless, our results do not suggest this as a possible cause based on our findings that the isolates obtained from noses, were all unrelated to those obtained from milk and bovine milk cheese, according to criteria designed by Tenover et al. (1995).

Our results showed high incidence of *S. aureus* in the raw milk (66.7%) and cheese (70.8%) samples analysed. Similar and higher values were also reported by other researchers (Adesiyun et al. 1998, Almeida Filho and Nader Filho 2000, De Buyser et al. 2001, Loguercio and Aleixo 2001, Araújo et al. 2002). Jørgensen et al. (2005) indicated that *S. aureus* from infected udders may contaminate bulk milk and subsequently, raw milk

products. Some factors could be associated with the contamination, as the unsatisfactory condition of utensils, inadequate handling of pasteurisation processes, and the use of raw milk by the home or small producer to make white soft cheese, constitute a health hazard to consumers, considering that the storage at high environmental temperature permitting growth of *S. aureus* can stimulate the production of staphylococcal enterotoxins (Araújo et al. 2002).

It has been stated that PFGE of *S. aureus* is the most discriminating genotyping tool and a good method to define clonal relationships. Macrorestriction analysis of the *S. aureus* permitted to type the strains and to establish the potential contamination source. The present study shows that *S. aureus* isolates from workers were different from that isolated from cheese. Raw milk appears to be the most potential source of cheese contamination since a relationship among 21.0 % strains were established. However, the major strains analysed from raw milk and cheese showed a high genetic diversity showing that the bacterial contaminations of these products are multiple as several farms, the processing environment and personnel.

Table 1 *S. aureus* isolated from dairy staff, raw milk, and Minas Frescal cheese in a dairy plant, Brazil.

Source	Samples collected	Positive Samples	%	N° Isolates
Dairy staff, nasal	46	15	32.6	15
Dairy staff, hands	46	14	30.4	14
Milk	24	16	66.7	24
Cheese	24	17	70.8	20
Total	140	62	45.0	73

Table 2 Cheeses contamination with *S. aureus* and their probable sources of contamination based on PFGE analysis.

Sample number and origin			PFGE profile	
Cheeses	Milk	Hands	PT	Subtype
2qt, 10qt	11lt, 11lat, 15lat			Z1
4qt	19lat, 20lt, 20lat, 13lat, 6lt, 6lat		Z	
24qt				L1
	24lt	16m1, 19m2	L	
4qat			T	
5qt			K	
5qat				U2
19qt			U	
22qt				U1
6qt			J	
7qt			Y	
8qt				AA1
23qt			AA	
13qt			P	
15qt			AG	
18qt			AE	
21qt				AE1
16qat			X	
18qat			C	
3qt				NT

NT – Not Typeable by PFGE

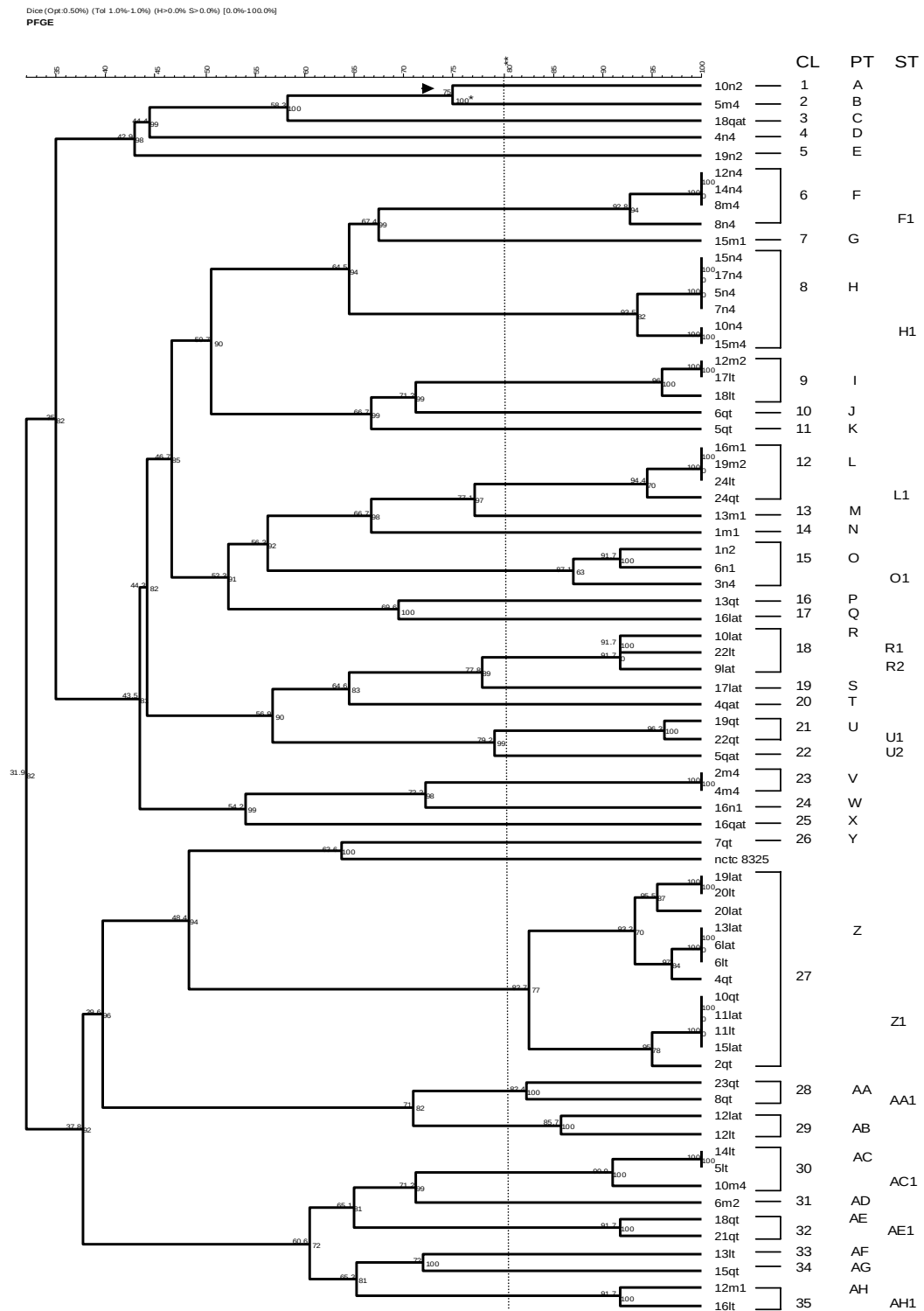


Fig. 1 Clonal relationships of 71 *S. aureus* isolates established with *SmaI* PFGE analysis. Clusters (CL) were labelled with arabic numbers, pulsotypes (PT) and subtypes (ST) with capital letters and letters and numbers, respectively. Similarity values; * Cophenetic correlations; ** Cut off (80%).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr^a. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade for her support in the molecular analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C. and Rosdahl, V.T. (1995) Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet Microbiol* **45**, 139-150.
- Adesiyun, A.A., Webb, L.A. and Romain, H.T. (1998) Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolates from bulk and composite milk and cattle handlers. *J Food Prot* **61**, 629-632.
- Almeida Filho, E.S. and Nader Filho, A. (2000) Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Rev Saúde Pública* **34**, 578-80.
- Araújo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L. and Freitas-Almeida, A.C. (2002) Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* **92**, 1172-7.
- Balaban, N. and Rasooly A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* **61**, 1-10.
- Bennett, R.W. and Lancette, G.A. (2001) *Staphylococcus aureus*. In *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual online*. Chapter 12. Available in: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Accessed on 14/02/2004.
- Carmo, L.S., Dias, R.S., Linardi, V.R., Sena, M.J., Santos, A.A., Faria, M.E., Pena, E.C., Jett, M. and Heneine, L.G. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* **19**, 9-14.

- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M. and Lafarge, V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* **67**, 1-17.
- Gündoğan, N., Citak, S. and Turan, E. (2006) Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. *Food Control*, **17**, 389-392.
- Hatakka, M., Björkroth, K.J., Korkeala, H.J., Asplund, K. and Mäki-Petäys. (2000) Genotypes and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J Food Prot*, **63**, 1487-1491.
- Jørgensen, H.J., Mørk, T., Caugant, D.A., Kearns, A. and Rørvik, L.M. (2005) Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl Env Microbiol*, **71**, 8352-8361.
- Kapur, V., Sischo, W.M., Greer, R.S. Whittam, T.S. and Musser, J.M. (1995) Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, **33**, 376-380.
- Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C. and Tenover, F.C. pp.264-282. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1986) Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp.1013-35. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A. and Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 505-520.

- Kwon, N.H., Park, K.T., Moon, J.S., Jung, W.K., Kim, S.H., Kim, J.M., Hong, S.K., Koo, H.C., Joo, Y.S. and Park, Y.H. (2005) Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother*, **56**, 624-632.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D. and Schwarz, S. (1999) Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*, **67**, 127-141.
- Loguercio, A.P. and Aleixo, J.A.G. (2001) Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, **31**, 1063-1067.
- Manie, T., Brozel, V.S., Veith, W.J. and Gouws, P.A. (1999) Antimicrobial resistance of bacterial flora associated with bovine products in South Africa. *J Food Prot*, **62**, 615-618.
- Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N. and Alfa, M. (2001) The Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, **39**, 3481-3485.
- Nascimento, J.S., Santos, K.R.N., Gentilini, E., Sordelli, D. and Bastos, M.C.F. (2002) Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol*, **85**, 133-144.
- O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F.C., Markey, B.K., Quinn, P.J., Pollock, P.J., Fanning, S. and Rossney, A.S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet Microbiol*, **109**, 285-196.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R.V., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J.,

- McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M. and Pfaller, M.A. (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **32**, 407-415.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33**, 2233-2239.
- Tondo, E.C., Guimarães, M.C., Henriques, J.A. and Ayub M.A. (2000) Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol*, **46**, 1108-14.
- VandenBergh, M.F.Q., Yzerman, E.P.F., van Belkum, A., Boelens, H.A.M., Sijmons, M. and Verbrugh, H.A. (1999) Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol*, **37**, 3133-3140.
- Vintov, J., Aarestrup, F.M., Zinn, C.E. and Olsen, J.E. (2003) Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol*, **95**, 133-147.
- Wylie, J.L. and Nowicki, D.L. (2005) Molecular epidemiology of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol*, **43**, 2830-6.
- Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H. and van Belkum, A. (2000) Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, **38**, 1931-1939.

Zadoks, R.N., van Leeuwen, W.B., Kreft, D., Fox, L.K., Barkema, H.W., Schukken, Y.H. and van Belkum, A. (2002) Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking, equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol*, **40**, 3894-3902.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – ARTIGO 2

Journal of Applied Microbiology

Including Letters in Applied Microbiology & Annual Symposium - the Official Journals of the Society for Applied Microbiology.

[Published for the Society for Applied Microbiology](#)

Edited by:
A. Gilmour

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2004: 51/133 (Biotechnology & Applied Microbiology); 48/84 (Microbiology)

Impact Factor: 1.835

Author Guidelines

Did you know... *Journal of Applied Microbiology* has no page charges?

Please note that these author guidelines have been updated recently. It is recommended that all authors check the guidelines thoroughly even if they have previously submitted an article to this journal.

...Quick Links...

- Manuscript submission: <http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/>
- Editorial Office: jam@oxon.blackwellpublishing.com
- Production Office: jam-proofs@oxon.blackwellpublishing.com
- Electronic Graphics: <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>
- Exclusive Licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jam_caf.pdf
- Colourwork Agreement form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf

The preparation and presentation of manuscripts

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

Format of papers

Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively, and should have line numbers. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off.

The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*.

Submissions

Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/>. If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant jam@oxon.blackwellpublishing.com. A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc), Rich Text Format (.rtf), Portable Document Format (.pdf) or PostScript (.ps) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

1. Full-length papers

The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

The paper will have the following sections:

- (a) **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- (b) **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- (c) **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 **96**(2):221; available at <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>);
- (d) **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- (e) **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- (f) **ACKNOWLEDGEMENTS;** and
- (g) **REFERENCES:** Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

Layout of references

The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). The following is an example of order and style to be used in the manuscript: Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127–135. Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office. Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91–96. London: The Royal Society of Chemistry. Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

English usage

Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

Headings

The hierarchy of the headings used is:

First Order

MATERIALS AND METHODS

Second Order

Sample preparation

Third Order

The media First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

Abbreviations and units

The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (*g*). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A).

Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names:

Acet., *Acetobacter*; Ac., *Acinetobacter*; Act., *Actinomyces*; Aer., *Aeromonas*; Ag., *Agrobacterium*; Alc., *Alcaligenes*; Alt., *Alteromonas*;

B., *Bacillus*; Bact., *Bacteroides*; Bord., *Bordetella*; Bran., *Branhamella*; Br., *Brucella*;

Camp., *Campylobacter*; Cit., *Citrobacter*; Cl., *Clostridium*; Coryne., *Corynebacterium*; Cyt., *Cytophaga*;

Des., *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper);

Edw., *Edwardsiella*; Ent., *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper); Erw., *Erwinia*; E., *Escherichia*;

Eu., *Eubacterium*;

Fl., *Flavobacterium*; *Fus.*, *Fusobacterium*;
G., *Gemella*;
H., *Haemophilus*;
Kl., *Klebsiella*; *Lact.*, *Lactobacillus*;
L., *Lactococcus*; *Leg.*, *Legionella*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Listeria*;
Meth., *Methanobacterium* or *Methanococcus* (spell out if both appear in same paper); *Mic.*, *Microbacterium*; *M.*, *Micrococcus*;
Mor., *Moraxella*; *Myc.*, *Mycobacterium*; *Myc.*, *Mycoplasma*;
N., *Neisseria*; *Nit.*, *Nitrobacter* or *Nitrosomonas* (spell out if both appear in same paper); *Noc.*, *Nocardia*;
Past., *Pasteurella*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Ple.*, *Plesiomonas*; *Pr.*, *Proteus*; *Ps.*, *Pseudomonas*;
Rh., *Rhizobium*; *R.*, *Ruminococcus*;
Salm., *Salmonella*; *Ser.*, *Serratia*; *Sh.*, *Shigella*; *Staph.*, *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *S.*, *Streptomyces*;
T., *Thiobacillus*;
V., *Vibrio*;
X., *Xanthomonas*;
Y., *Yersinia*.

For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp
 In this, many species names not included in the Approved Lists (www.sv.cict.fr/bacterio) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered. The nomenclature used when describing the species of salmonella should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word "serotype" and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalised (for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm.* Typhimurium).

Nucleotide sequences

- (1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript;
- (2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information;
- (3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, **, †† etc. For an example of JAM table style, [click here](#).

Figures

Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of JAM figure style, [click here](#).

Photographs. These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

Electronic submission. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

Colour figures. It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf. If you are unable to download the form please contact the

Editorial Office.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Supplementary material

Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

Exclusive licence

Papers are accepted on the understanding that the *Journal* is granted exclusive licence to publish them.

OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to \$2500), excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM_OOF.pdf

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s)
Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

Abbreviations

These are some examples of common abbreviations used in *Journal of Applied Microbiology*:

A, Absorbance
 approx. or ca, approximately
 at. wt., atomic weight
 bp, base pairs
 by vol, by volume (for greater than two component liquids)
 cm², per square centimetre
 cpDNA, chloroplast DNA
 D, attenuation (see <http://www.chem.gmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html>)
 Da (kDa), daltons (kilodaltons)
 edn, edition
 ed., editor(s)
 ergs. sq. mm⁻¹, ergs per square millimetre
 IU, International unit
 kbp, kilobase pair
 Mabs, monoclonal antibodies
 MIC, minimal inhibitory concentration
 mol l⁻¹, moles per litre
 Mr, molecular mass
 nm, nanometre
 OD, optical density
 OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis
 ORF or orf, open reading frame
 P, probability
 PFG, pulsed field gradient
 ppm, parts per million
 recDNA, recombinant DNA
 rev min⁻¹, revolution per minute
 SD, standard deviation
 SE, standard error
 subsp., subspecies
 U, enzyme unit
 UV, ultraviolet
 vs, versus
 v/v, volume per volume
 w/v, weight per volume
 w/w, weight per weight

There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, HPLC, RNA or SDS-PAGE.

OnlineEarly

Journal of Applied Microbiology is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service.

OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jam_caf.pdf

Colourwork Agreement form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos deste trabalho foram tipificar fenotípica e genotipicamente *S. aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal obtidos em um laticínio em Goiás, para estabelecer a provável fonte da bactéria para o queijo. Para isso, foram utilizadas as técnicas de tipificação fenotípica e genotípica, como a suscetibilidade a antimicrobianos e a macrorrestrição de DNA por endonuclease de restrição (*Sma*I) ou RFLP seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nos dois artigos anexados, o antibiograma permitiu a classificação das cepas em doze perfis diferentes e o PFGE em 47 perfis eletroforéticos diferentes, demonstrando maior poder discriminatório, como já era esperado.

Apesar da diversidade genética encontrada entre as cepas isoladas, observou-se que houve maior correlação entre as isoladas do queijo e do leite (Figura 2-Anexo 3), do que entre aquelas isoladas do queijo e dos manipuladores, sugerindo o leite cru como a provável fonte de *S. aureus* para o queijo Minas Frescal. Entre as cepas isoladas dos manipuladores, as provenientes das mãos apresentaram correlação tanto com o leite cru, quanto com as amostras de queijo, sugerindo contaminação cruzada entre as mãos e o leite cru durante o processo de fabricação. Como não foi observada correlação de cepas isoladas do nariz dos manipuladores, com o queijo, estes não parecem ser fontes importantes da bactéria para o produto final, nesta indústria.

Analisando os perfis originados pelo antibiograma, observa-se que apesar de ter sido menos discriminatório, esta técnica foi capaz de agrupar cepas geneticamente semelhantes pelo PFGE (Tabela 1-Anexo 3), mostrando-se como um método indicado

para triagens, ou para laboratórios que não dispõem de técnicas moleculares para uso em rotina, como é o caso de vários laboratórios clínicos e de alimentos, inclusive oficiais, no Brasil. Além disso, possui outras vantagens como o baixo custo, a padronização, a disponibilidade de uso, a simplicidade da técnica e ainda permite o conhecimento acerca da susceptibilidade a antimicrobianos, o que pode ser interessante, dependendo do tipo de estudo em que for aplicado.

A técnica de PFGE, amplamente utilizada em vários países, tem sido aplicada em alguns laboratórios brasileiros. É uma técnica que apresenta custo elevado com equipamentos e material de consumo, pelo menos para os padrões brasileiro e regional. Pela nossa experiência, foi uma técnica de difícil padronização, porém com resultados eficientes e conclusivos.

Este foi o primeiro trabalho utilizando a técnica de PFGE em estudo epidemiológico associado a alimentos em nosso estado e acreditamos que a perspectiva de aplicação da técnica na microbiologia de alimentos seja muito importante e promissora.

Apesar de não ter sido objetivo da pesquisa, observamos que os manipuladores de alimentos portaram mais de uma cepa diferente de *S. aureus*, tanto nas mãos como no nariz durante o período de estudo (um ano). Por outro lado, constatamos a presença de um portador assintomático que apresentou cepas idênticas, isoladas do mesmo sítio, durante todo o período da coleta (Figuras 1 e 3-Anexo 3). Este aspecto evidencia a importância da seleção de isolados desde o início da análise microbiológica, onde a identificação de mais de uma colônia por placa, baseada em aspectos morfológicos e bioquímicos, permitiu a constatação destas diferentes cepas coabitando os manipuladores e também a identificação de cepas com características diferentes, típicas e atípicas, em leite cru e queijo e que foram identificadas positivamente para a bactéria em questão.

Diante destas observações, concluímos que o uso concomitante de técnicas fenotípicas e genotípicas, nas nossas condições, é muito importante em estudos epidemiológicos e que a oportunidade de utilizar a técnica de PFGE no nosso trabalho pôde enriquecer nossos resultados e ainda contribuir para a adoção de uma nova ótica de atuação dos órgãos oficiais de controle de alimentos no estado e no país.

Apesar de nesse estudo o manipulador não ter sido considerado a principal fonte da bactéria para o queijo, evidenciou-se a sua importância como um potencial disseminador do microrganismo na indústria, tanto de cepas de origem animal, como as oriundas do leite cru, por contaminação cruzada, quanto pela disseminação de cepas provenientes do homem, por contato direto com os alimentos.

A realidade observada nesta pequena indústria pode ser estendida a várias outras e também à manipulação de outros tipos de alimentos. Os funcionários da indústria trabalham muitas vezes, como foi observado nos momentos da coleta, sem condições que garantam a inocuidade dos alimentos. Frequentemente apresentavam-se com lesões nas mãos, unhas, resfriados e pela estrutura social e estrutural, não dispunham de tempo ou condições para consultar um médico ou serem afastados do trabalho até a solução dos problemas. O queijo Minas Frescal, nesta indústria, é totalmente manufaturado, quase um procedimento artesanal, como acontece com a maioria dos queijos comercializados nas feiras, padarias, mercados e até supermercados da cidade de Goiânia e do interior do Estado de Goiás.

Quanto à principal causa de contaminação do produto final identificada, ou seja, o leite cru, existem normas para utilização desta matéria-prima na produção do queijo Minas Frescal. O leite deve ser pasteurizado, conforme citado anteriormente, porém, não é isso o que se observa nas indústrias. A indústria avaliada dispunha do pasteurizador, mas o leite era somente aquecido para a melhor temperatura de atuação do coalho e não sofria o

processamento térmico recomendado. Observou-se contagens elevadas de *S. aureus* no queijo, acima dos padrões recomendados pela legislação brasileira, em 54,2% das amostras analisadas. Este fato caracteriza o produto como potencialmente capaz de originar casos ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

É muito difícil, nas condições brasileiras, produzir o leite cru com melhor qualidade higiênico-sanitária, ou com uma carga microbiana inicial mais baixa, apesar de que esforços neste sentido estão sendo implementados no país. Portanto, faz-se necessário um maior controle do produto final que chegará à mesa do consumidor.

Há muitos anos se conhece o problema da presença de *S. aureus* no queijo Minas Frescal, mas apesar da evolução dos serviços de fiscalização, a realidade pouco mudou. Sabe-se o que deve ser feito, mas existem falhas na concretização das medidas, tanto educativas, quanto fiscalizadoras.

Fica um desafio para as autoridades responsáveis pelo controle sanitário dos alimentos no estado e municípios. Apesar das medidas higiênicas ambientais e pessoais exigidas das indústrias e dos produtores, o processo de fabricação do queijo Minas Frescal recomendado não está sendo devidamente aplicado e conseqüentemente está prejudicando todo o controle da produção deste alimento. Acreditamos na melhoria dos princípios e atitudes das pessoas envolvidas em toda a cadeia de produção dos alimentos, no sentido de garantir melhores produtos no mercado interno e conseqüentemente ampliando a possibilidade de comercialização do produto, agregando valor ao mesmo pela melhoria da qualidade sanitária.

ANEXO 1

Declaramos, para fins de direito, que o artigo intitulado "Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Manipuladores, Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil / Antibiogram as Instrument of Phenotypic Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Personnel, Raw Milk and Minas Frescal Cheese in a Dairy Plant of Goiás, Brazil" de autoria de Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, Patrícia Pimentel Santos, Maria Raquel Hidalgo Campos, Liana Jayme Borges, Álvaro Bisol Serafini foi aprovado para publicação em versão impressa e eletrônica (<http://www.scielo.br/bjvras>) no periódico Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, encontrando-se no em vias de publicação.

Atenciosamente,

Gustavo Casari Monreal

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

ANEXO 2

De: <jam@oxon.blackwellpublishing.com>
PARA: <mcdantas@brturbo.com.br>; <mcdantas@iptsp.ufg.br>
Assunto: Manuscript submitted - Applied Microbiology JAM-2006-0407
Data: quarta-feira, 22 de março de 2006 22:15

March 22nd, 2006

Dear Dr André

Your manuscript has been successfully submitted.

As corresponding author, you will receive future communications via email. Please make a note of your manuscript number:
JAM-2006-0407

If you provided details of co-authors during your manuscript submission, they will also receive an email containing this manuscript reference number as confirmation that you have successfully submitted the manuscript online.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Applied Microbiology Manuscript Central at:

<http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com>

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact:

jam@oxon.blackwellpublishing.com (JAM)

or

lam@oxon.blackwellpublishing.com (LAM)

Thank you for your submission.

Regards

Carole Saunders
Editorial Office Co-ordinator
Prepress Projects Ltd
Algo Business Centre
Glenn Road
PERTH PH2 0NJ
UK

My direct line
01738 450488 (international +44 17 38 45 04 88)
Fax number: 0870 055 8333 (international +44 87 00 55 83 33)

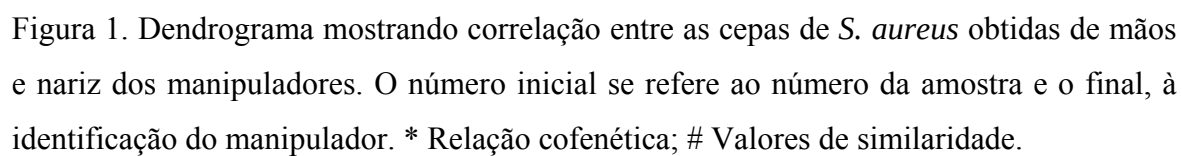
ANEXO 3

Tabela 1 Classificação de cepas de *S. aureus* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal, de acordo com seus perfis fenotípicos e genotípicos.

Número da amostra e origem ^a	Perfil de susceptibilidade ^b	Fenótipo	Genótipo (PFGE)
2, 4M4, 12M2, 17L, 18L, 5Q, 5Q', 19Q, 22Q	SSSSSSS	A	I, K, U, U1, U2, V
6M2, 4N4, 10M4, 12M1, 5L, 14L, 16L, 15Q, 18Q, 21Q	ISSSSSS	B	D, AC, AC1, AD, AE, AE1, AG, AH, AH1
8, 12, 14N4, 8M4, 13, 15M1, 9L', 10L', 12L, 12L', 17L', 19L', 20L, 20L', 22L, 4Q', 7Q, 8Q, 16Q', 23Q	SSSSSSR	C	F, F1, G, M, R, R1, R2, S, T, X, Y, Z, AA, AA1, AB
1N2, 3, 5, 7, 10, 15, 17N4, 15M4, 6, 16N1, 13L', 16L', 6Q, 18Q'	ISSSSSR	D	C, H, H1, J, O, O1, Q, W, Z
13L	ISRSSSS	E	AF
5M4, 19N2, 6L, 6L', 11L, 4Q, 10Q, 24Q	SSRSSSR	F	B, E, L1, Z, Z1
13Q	RSSSSSR	G	P
11L', 24L	ISRSSSR	H	L, Z1
10N2, 15L'	RSRSSSR	I	A, Z1
16M1, 2Q	ISRSSRR	J	L, Z1
1M1	RSSRRRR	K	N
19M2	ISRISRR	L	L

^a M – Mão; N – Nariz; L – Leite; Q – Queijo.

^b Resistência (R), Susceptibilidade intermediária (I) e Susceptibilidade (S). Os antibióticos estão organizados na sequência: eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina.



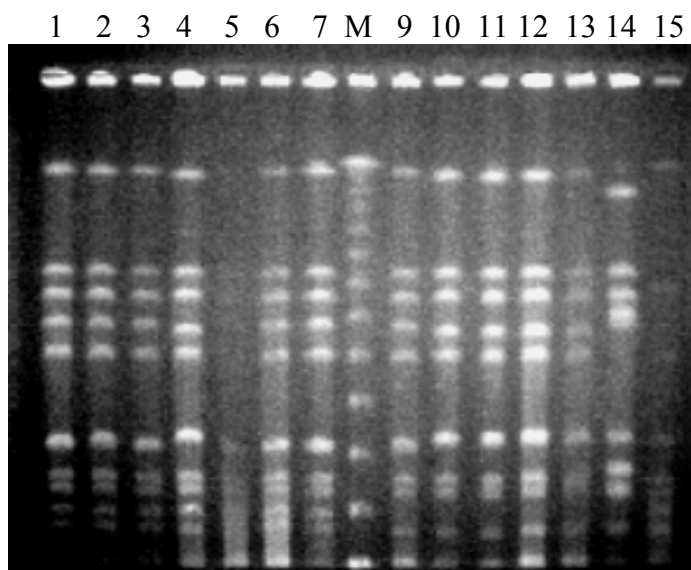


Figura 2 Perfis eletroforéticos de PFGE de *S. aureus* isolados de leite (linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, e 13), queijo (linhas 1, 9, 10 e 15) e mão (linha 14). Linha M, marcador (lambda ladder – Bio-Rad).

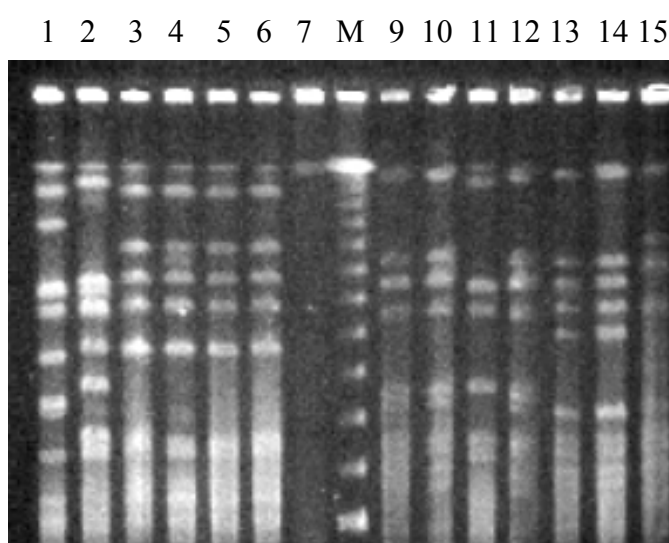


Figura 3 Perfis eletroforéticos de PFGE de *S. aureus* isolados de manipuladores (linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6) e leite (linhas 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Linha M, marcador (lambda ladder – Bio-Rad).

ANEXO 4

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)