

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTAFILOCOCOS MANITOL
POSITIVOS ISOLADOS DE MORCILHAS DE FABRICAÇÃO ARTESANAL
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE PELOTAS**

TIANE MARTIN DE MOURA
Bacharel em Nutrição

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTAFILOCOCOS MANITOL
POSITIVOS ISOLADOS DE MORCILHAS DE FABRICAÇÃO ARTESANAL
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE PELOTAS**

TIANE MARTIN DE MOURA
Bacharel em Nutrição

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2011

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

M929a Moura, Tiane Martin de

Análise fenotípica e genotípica de estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas de fabricação artesanal comercializadas na cidade de Pelotas / Tiane Martin de Moura – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação: Prof. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientação: Prof. Ana Cláudia Franco

1. Staphylococcus 2. Microbiologia dos alimentos 3. Resistência microbiana a drogas 4. Alimentos de origem animal I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Franco, Ana Cláudia, co-orient. III. Título.

CDU 579.86(043)

TIANE MARTIN DE MOURA
NUTRICIONISTA
UFPel

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28 / 02 / 2011
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 18 / 04 / 2011
Por:


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
Orientadora - ICBS-UFRGS


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


ALESSANDRA EINSFELD FERREIRA
HSCM-RS


AMANDA DE SOUZA DA MOTTA
Faculdade de Veterinária - UFPel


FÁTIMA MENEZES BENTO
ICBS-UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é um resultado de um grande esforço, não somente de muitas mãos, mas principalmente, de muitas mentes. A todos que estiveram envolvidos neste trabalho, o meu "Muito Obrigada".

Ao Prof. Aleixo (meu querido Mestre) um sincero e especial agradecimento pelos 3 anos de convivência. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelas oportunidades, pelas cobranças, pelo apoio e total confiança em mim depositada. E foi esta confiança que me trouxe até aqui e que me motiva a seguir em frente.

À Prof. Ana Paula Guedes Frazzon (Aninha) por ter me recebido como sua aluna de mestrado e ter me confiado esta responsabilidade. Obrigada pela orientação, dedicação, pelos ensinamentos transmitidos e pela paciência. Agradeço também os abraços, as conversas paralelas, os conselhos, as risadas e pelo conforto de tua amizade, sempre presente.

À Prof. Sueli Van der Sand (tão querida e brava) que me acolheu com toda atenção e carinho, me auxiliando nos momentos duvidosos do trabalho na bancada e que me mostrou que estudar rotas metabólicas pode ser muito divertido e que a genética da bioquímica é fantástica!

À Prof. Ana Cláudia Franco (a outra Aninha) por ter permitido o "uso e abuso autorizado" das dependências do Laboratório de Virologia para a realização da etapa molecular do trabalho, pelas dúvidas levantadas, pela troca de informações e pela amizade.

Ao Dr. Frans Rijsewijk (*in memorium*), embora tendo acompanhado de longe meu trabalho, foi sempre muito prestativo quando solicitado. Obrigada pelo apoio, críticas, observações e também pela amizade fora do laboratório.

Ao doutorando Fabrício Campos, por me apresentar o mundo da biologia molecular e por me provar que existe muito mais além do que é perceptível aos nossos olhos. Agradeço os ensinamentos, a orientação, as cobranças, as críticas, a ajuda e ao tempo dedicado. E ao meu namorado Fabrício, obrigada pelo carinho, companhia e compreensão.

À equipe do Laboratório de Virologia (Lab. 208), em especial Marthita e Esmaille pela ajuda, pelas dúvidas sanadas, pela troca de experiências, pela companhia nas aulas e até altas horas no laboratório e pela amizade.

Às meninas do Laboratório de Micologia (Lab. 209) por terem me acolhido e terem feito deste, minha segunda casa. Um agradecimento especial às amigas Fran, Mica, Ana e Elis que fizeram minha caminhada ser mais leve e alegre entre tantas discussões científicas acompanhadas de um bom chimarrão.

Às instituições UFPEL e UFRGS que mantiveram as portas abertas para a execução deste trabalho.

Aos funcionários, professores, colegas destas instituições, muitíssimo obrigado.

À minha família que, mesmo distante, me deu forças para concluir este trabalho e não mediram esforços para que eu pudesse continuar. A meus pais Eloino e Ivany, agradeço por todo apoio e amor incondicional.

Ao CNPq pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTAFILOCOCOS MANITOL POSITIVOS ISOLADOS DE MORCILHAS DE FABRICAÇÃO ARTESANAL COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE PELOTAS¹

Autor: Tiane Martin de Moura
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon
Co-orientadora: Ana Cláudia Franco

RESUMO

A morcilha é uma iguaria muito consumida no sul do Brasil, porém a falta de estudos avaliando a potencial virulência de estafilococos isolados destas preparações é motivo de preocupação para o consumidor. O objetivo do estudo foi identificar os estafilococos manitol positivo isolados de morcilhas artesanais; verificar a resistência antimicrobiana; analisar e correlacionar o perfil fenotípico e genotípico da coagulase nos isolados, detectar o polimorfismo do gene *coa* e seu padrão de restrição enzimática; investigar através de técnica de PCR a presença dos genes das enterotoxinas clássicas e determinar se a técnica multiplex PCR pode ser empregada como ferramenta útil na identificação destes genes. Foram obtidos 82 isolados, destes 75,61 % eram estafilococos coagulase negativos e 24,3 % estafilococos coagulase positivos. Através do perfil bioquímico foram identificadas 9 espécies, sendo *S. saprophyticus* e *S. carnosus* as mais prevalentes. O fenótipo de resistência à tetraciclina e eritromicina foi o mais observado e 13 isolados apresentaram multirresistência. O gene *coa* foi detectado em 16 isolados e identificados 11 perfis de restrição enzimática. 33 isolados foram positivos para pelo menos um gene de enterotoxina e as espécies mais frequentes foram *S. saprophyticus* e *S. carnosus*. Os genes *sea*, *seb* e *sec* foram os mais prevalentes e a multiplex PCR amplificou os genes *seb*, *sec* e *see*. Conclui-se que a microbiota das morcilhas analisadas consiste de espécies do grupo coagulase negativo representando bactérias potencialmente patogênicas devido à resistência antimicrobiana e à presença de genes de enterotoxinas, chamando a atenção para este grupo de estafilococos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (95 p.) Fevereiro, 2011.

FENOTÍPIC AND GENOTÍPIC ANALISYS OF STAPHYLOCOCCI MANNITOL POSITIVE ISOLATES FROM ARTISANAL MORCILLA MARKETED IN PELOTAS²

Author: Tiane Martin de Moura
Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon
Co-supervisor: Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

The morcilla is a delicacy consumed in Southern Brazil, but the lack of studies evaluating the potential virulence of staphylococci isolated from these preparations is of concern to the consumer. The aim of the study was mannitol positive staphylococci isolated from artisanal morcilla; antibiotic resistance, analyze and correlate the phenotypic profile and genotype in isolates of coagulase, to detect the polymorphism of *coa* gene and its pattern of restriction enzyme, and to investigate the technique of PCR the presence of enterotoxin genes and determine whether the multiplex PCR technique can be employed as a useful tool in identifying these genes. We obtained 82 isolates, 75.61% of these were coagulase negative and coagulase positive 24.3%. Through biochemical profile were identified 9 species, *S. saprophyticus* and *S. xylosus* being most prevalent. The phenotype of resistance to tetracycline and erythromycin was the most observed and 13 isolates showed multidrug resistance. The *coa* gene was detected in 16 isolates and identified 11 profiles of restriction enzyme. 33 isolates were positive for at least one enterotoxin gene and the most frequent species were *S. saprophyticus* and *S. carnosus*. The genes *sea*, *seb* and *sec* were most prevalent and multiplex PCR amplified genes *seb*, *sec* and *see*. We conclude that the microbiota of morcilla analyzed consists of species of coagulase-negative group representing potentially pathogenic bacteria due to antimicrobial resistance and the presence of enterotoxin genes, calling attention to this group of staphylococci.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (95 p.) February, 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Objetivo geral	4
1.2 – Objetivos específicos	4
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 – Produtos de origem animal	6
2.2 – Embutidos e salsicharias	7
2.2.1 – Morcilha.....	9
2.3 – O Gênero <i>Staphylococcus</i>	12
2.3.1 – Estafilococos coagulase positivo	13
2.3.1.1 O gene da coagulase (<i>coa</i>) e seu polimorfismo	14
2.3.2 – Estafilococos coagulase negativo	17
2.4 – Resistência antimicrobiana	19
2.5 – Gastrenterite estafilocócica	20
2.6 – Enterotoxinas estafilocócicas	21
2.6.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas	25
2.7 – Legislação brasileira para alimentos	27
3 – MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 – Coleta das amostras	29
3.1.1 – Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp.....	29
3.2 – Reativação de amostras	30
3.3 – Provas bioquímicas	30
3.3.1 – Teste de fermentação em ágar sal manitol.....	30
3.3.2 – Teste da catalase	31
3.3.3 – Teste da coagulase em tubo.....	31
3.3.4 – Teste de Voges-Proskauer (VP)	31
3.3.5 – Teste de fermentação de açúcares	32
3.3.6 – Controle de qualidade das provas de identificação	32
3.4 – Teste de susceptibilidade antimicrobiana	33
3.5 – Extração de DNA total.....	33
3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene da coagulase (<i>coa</i>)	34
3.6.1 – Detecção de Perfil de Polimorfismo por Restrição Enzimática (RFLP) do gene da coagulase	35
3.7 – Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA.....	35

3.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A e D (<i>sea</i> e <i>sed</i>).....	36
3.9 – Multiplex PCR para detecção dos genes das enterotoxinas B (<i>seb</i>), C (<i>sec</i>) e E (<i>see</i>)	36
3.10 Eletroforese em gel de agarose	37
4 – RESULTADOS.....	38
4.1 – Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de morcilhas artesanais ...	38
4.2 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana	39
4.3 – Frequência do gene coagulase (<i>coa</i>) e atividade da coagulase	41
4.4 – Sequenciamento dos produtos da região 16S rRNA.....	42
4.5 – Polimorfismo do gene <i>coa</i> por PCR- RFLP	43
4.6 – Prevalência e distribuição dos genes de enterotoxinas (<i>se</i>).....	45
5 – DISCUSSÃO	49
5.1 – Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de morcilhas artesanais ...	49
5.2 – Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados	51
5.3 – Frequência do gene coagulase (<i>coa</i>) e atividade da coagulase	54
5.4 – Polimorfismo do gene <i>coa</i>	55
5.5 – Prevalência e distribuição dos genes de enterotoxinas (<i>se</i>).....	56
6 – CONCLUSÕES	61
7 - PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
VITA	83

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação de genes de enterotoxinas em <i>Staphylococcus</i> spp. utilizados no estudo.....	37
TABELA 2 Distribuição dos <i>Staphylococcus</i> spp. manitol positivos isolados a partir de morcilhas artesanais em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	40
TABELA 3 Distribuição da resistência e susceptibilidade antimicrobiana nos <i>Staphylococcus</i> spp. manitol positivo isolados de morcilhas artesanais.....	41
TABELA 4 Análise genotípica e fenotípica do gene da coagulase em <i>Staphylococcus</i> spp. manitol positivos isolados de morcilhas artesanais.....	43
TABELA 5 Perfis de restrição enzimática do gene da coagulase em <i>Staphylococcus</i> spp. manitol positivos isolados de morcilhas artesanais.....	45
TABELA 6 Distribuição dos genes de enterotoxinas em estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas artesanais.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Comparação da localização dos sítios de restrição da enzima <i>AluI</i> dentro do gene da coagulase de duas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> A e B.....	15
FIGURA 2 Exemplos de ligações de antígenos convencionais e superantígenos com Receptores de Células T e MCH de classe II.....	23
FIGURA 3 Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> representativos.....	42
FIGURA 4 Digestão dos produtos de amplificação do gene <i>coa</i> com enzima de restrição <i>AluI</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> representativos.....	44
FIGURA 5 Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação dos genes das enterotoxinas A, B, C, D e E em <i>Staphylococcus aureus</i> representativos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: “American Type Culture Collection”
BHI: “Brain Heart Infusion”
Blast: “basic local alignment search tool”
CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”
CLO: Cloranfenicol
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
ECoN: Estafilococos Coagulase Negativo
ECoP: Estafilococos Coagulase Positivo
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERI: Eritromicina
EUA: Estados Unidos da América
Fig.: Figura
GEN: Gentamicina
GenBank: Banco de Dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”)
gene *coa*: Gene da coagulase
gene *sea*: Gene da enterotoxina A
gene *seb*: Gene da enterotoxina B
gene *sec*: Gene da enterotoxina C
gene *sed*: Gene da enterotoxina D
gene *see*: Gene da enterotoxina E
h: Hora
IAE: Intoxicação Alimentar Estafilocócica
IFN: Interferon
IL: Interleucina
Kb: Kilobases
KDa: Kilo Dalton
LEAN: Laboratório de Ensaio e Análise de Alimentos
M: marcador
mg: miligrama
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
Min.: minutos
mL: mililitros
mM: milimolar
mPCR: multiplex PCR
MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* Sensíveis à Meticilina
n.: Número
ng: Nanogramas
°C : Graus Celsius
p.: Página
pb: Pares de Bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PF: Oligonucleotídeo “Forward”
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
POA: Produtos de Origem Animal
PR: Oligonucleotídeo “Reverse”
%: Porcentagem
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RFLP: Perfil de Polimorfismo por Restrição Enzimática
RNA: Ácido Ribonucleico
RPM: Rotações Por Minuto
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
SAg: Superantígenos
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SE: Enterotoxina Estafilocócica (“staphylococcal enterotoxina”)
SEA: Enterotoxina A
SEB: Enterotoxina B
SEC: Enterotoxina C
SED: Enterotoxina D
SEE: Enterotoxina E
seg.: Segundo
SPE: Exotoxinas Pirogênicas Estreptocócicas
Tab.: Tabela
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TCR Receptores de células T
TE: Tampão Tris-EDTA
TET: Tetraciclina
TGI: Trato Gastrointestinal
TNF: Fator de Necrose tumoral (“Tumor Necrosis Fator”)
TSST-1: Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (“Toxic Shock Syndrome 1”)
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UFPEL: Universidade Federal de Pelotas
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV: Luz Ultravioleta
µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrômetro
µM: micromolar
v.: Volume
VAN: Vancomicina
VP: Voges-Proskauer

1 – INTRODUÇÃO

A morcilha, também chamada "morcela" ou "chouriço", é constituída por uma mistura de sangue bovino, gordura e peles de porco, sal, cebola e especiarias, embutida em tripa natural ou sintética, amarrada manualmente e imersa em um banho de água quente. Existem muitas variedades desta iguaria em toda Península Ibérica e na América Latina. Para o Brasil, a morcilha foi trazida já nos primeiros tempos da colonização por portugueses e espanhóis, tornando-se muito popular no Sul do país, na Argentina e no Uruguai. Os embutidos, como muitos outros produtos de origem animal, são originariamente contaminados por uma gama de gêneros microbianos. Os principais grupos de microrganismos saprófitas existentes nos embutidos são microrganismos mesófilos, halotolerantes, cocos Gram positivos, bactérias ácido-lácticas, bolores e leveduras.

Os microrganismos presentes nestes produtos podem ser oriundos do trato gastrointestinal (TGI) e pele de animais, manipulação ou devido à deficiência nas condições de higiene durante o seu processamento. A ingestão de alimentos que, eventualmente, estiverem contaminados por microrganismos, como as bactérias, fungos, protozoários e vírus, causadores de doenças, pode permitir que os patógenos e/ou seus metabólitos invadam os

flúidos ou os tecidos do hospedeiro causando as denominadas doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Entretanto, as bactérias, por sua diversidade e patogenia, constituem o grupo mais importante e mais comumente associado às DTAs. No Brasil entre os anos de 1999 a 2009 foram registrados 6.349 surtos de DTAs envolvendo 123.917 pacientes e 20,5 % dos casos foram causados por *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são cocos Gram positivos e tendem a formar agrupamentos, semelhantes a cachos de uva. Possuem diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , são imóveis e não formadores de esporos. Apresentam uma distribuição ubiquitária na natureza, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região nasofaríngea de mamíferos e aves. Os estafilococos produzem inúmeros fatores de virulência, que promovem sua sobrevivência em diversos ambientes e conseqüentemente a sua disseminação, tais como enzimas e toxinas. O gênero é composto por 45 espécies divididas em dois grupos: Estafilococos Coagulase Positivo (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativo (ECoN). No grupo dos ECoP, a espécie *Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em infecções nosocomiais e frequentemente responsável por surtos de intoxicação alimentar, quando a espécie envolvida tem a capacidade de expressar diferentes enterotoxinas. As espécies pertencentes ao grupo dos ECoN desempenham um papel importante como componente natural da microbiota de humanos e animais. Entretanto, a conversão destes microrganismos de simbiontes a patógenos humanos tem sido um reflexo direto do uso de implantes médicos invasivos, sendo responsáveis por infecções no trato urinário, feridas, septicemias e

endocardites em indivíduos imunocompetentes. Neste grupo, a espécie mais prevalente é *Staphylococcus saprophyticus*.

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas. Estas toxinas são resistentes ao calor (termoestabilidade) e à hidrólise por proteases gastrintestinais e jejunais. Os alimentos mais susceptíveis a apresentarem toxina estafilocócica são os cremes deficientemente armazenados e refrigerados, carnes preparadas, sanduíches e mesmo o leite, se incorretamente refrigerado. Além das DTAs, a presença de microrganismos nos alimentos também é importante devido ao fato de que, bactérias resistentes aos antimicrobianos podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio de alimentos contaminados e transferir os genes de resistência às bactérias da microbiota endógena ou potencialmente patogênicas do trato gastrointestinal dos seres humanos. A seleção e a disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos são o resultado de uma pressão seletiva imposta pelo homem, seja pelo uso abusivo de antimicrobianos, pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido e pelo emprego desses fármacos como fatores de crescimento na produção animal.

O Ministério da Saúde, através da Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu o padrão microbiológico sanitário para alimentos e determinou os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises de alimentos destinados ao consumo humano. A especificação da enumeração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de ECoP por grama ou mililitro de alimento

para estafilococos coagulase positivo, tem por objetivo substituir a determinação de *S. aureus*. Contudo, estudos já isolaram ECoN enterotoxigênicos das mãos de manipuladores de alimentos, demonstrando que a presença deste grupo nos alimentos também é importante para a saúde pública. Entretanto, a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase positivos. A falta de estudos avaliando a presença dos fatores de virulência e resistência em isolados de estafilococos manitol positivo isolados de morcilhas artesanais na cidade de Pelotas, RS, justifica o presente estudo.

1.1 – Objetivo geral

Isolar e identificar estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas de fabricação artesanal comercializadas na cidade de Pelotas (RS), avaliar o fenótipo de resistência aos antimicrobianos e analisar o perfil fenotípico e genotípico dos fatores de virulência desta população.

1.2 – Objetivos específicos

A - Isolar e identificar fenotipicamente os estafilococos manitol positivos a partir de amostras de morcilhas artesanais comercializadas no Mercado Público de Pelotas;

B - Traçar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados *Staphylococcus* spp.;

C - Analisar e correlacionar o perfil fenotípico e genotípico da coagulase nos isolados;

D - Detectar o polimorfismo do gene *coa* por PCR-RFLP e observar se o padrão de restrição do gene pode ser empregado para a identificação ou agrupamento de isolados de morcilhas;

E - Investigar através de técnica de PCR a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SED, respectivamente, nos isolados;

F - Determinar se a técnica de PCR multiplex pode ser empregada como uma ferramenta útil na identificação destes cinco genes de enterotoxinas.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Produtos de origem animal

Vários alimentos podem servir como fontes de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), no entanto, os Produtos de Origem Animal (POA) como leites, carnes e seus subprodutos são importantes fontes de toxinfecções humana causada por uma variedade de patógenos, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Estes microrganismos são membros da microbiota do TGI de animais (Nørrung et al., 2009).

Durante a produção de um alimento, as normas de higiene satisfatória são essenciais para promoção e manutenção de um alimento livre de microrganismos patogênicos. O alimento pode sofrer contaminações por agentes patogênicos resultantes de eventuais deficiências no processamento ou inconformidades na sua manipulação e conservação. Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento, armazenamento e higiene em toda a linha de processo de produtos cárneos são fatores que favorecem a transmissão de patógenos a humanos através dos alimentos (Mesquita et al., 2006). A rota de transmissão desta microbiota animal para os seres humanos ocorre pela manipulação, produção ou consumo de carnes contaminadas e de

seus derivados. Os manipuladores de alimentos podem ser portadores assintomáticos de vários microrganismos podendo transferi-los para os produtos gerando possíveis surtos de origem alimentar (Oliveira et al., 2003).

2.2 – Embutidos e salsicharias

Entende-se por embutidos os produtos constituídos a base de carne picada e condimentada, com forma geralmente simétrica. São embutidos, ou seja, envazados sob pressão em um recipiente ou envoltório de origem orgânica ou inorgânica, aprovado para este fim. Salsicharias são os produtos preparados à base de carne ou sangue, vísceras e outros produtos ou subprodutos animais, que foram autorizados para o consumo humano, sofrendo a adição de diversas substâncias, também devidamente aprovadas para tal fim (Roça, 2008).

Os métodos de cocção destes produtos podem ser fracos ou úmidos. Estes processos têm como finalidades: dar consistência firme por coagulação de proteínas e desidratação parcial; fixar a cor dos embutidos curados, por desnaturação da mioglobina e formação final de nitroso hemocromo e também pasteurizar para prolongar sua vida útil. Os embutidos cozidos em defumadores, geralmente alcançam a temperatura interna de 68-72 °C, já os cozidos em tripas impermeáveis à água ou em moldes metálicos alcançam temperaturas internas inferiores como 66 a 68 °C (Roça, 2008).

Geralmente, as técnicas de processamento podem envolver vários tratamentos, incluindo salga (adição de cloreto de sódio); cura (adição de cloreto de sódio acrescido de outros aditivos - nitrito de sódio, nitrato de

potássio ou polifosfato); defumação; secagem; fermentação e tratamento térmico aplicados isoladamente ou em combinações (Prado et al., 2000).

A cura apesar de ter sido muito utilizada antigamente como meio de preservação da carne, hoje ela é empregada mais para proporcionar sabor e desenvolvimento da cor em alimentos. Os ingredientes clássicos da cura são o cloreto de sódio como ingrediente principal, nitrito ou nitrato e açúcar (sacarose ou glicose). Alguns produtos contendo adjuvantes como fosfatos, ascorbato de sódio ou eritorbato de sódio, sorbato de potássio, glutamato monossódico, proteína vegetal hidrolisada, lactatos ou especiarias, também podem ser adicionados (Jay, 2005). O cloreto de sódio tem como função prevenir o crescimento microbiano antes e após a cura, e a concentração de até 2,5% pode ser encontrada no produto final. Nitrito ou nitrato tem a finalidade de estabilizar a cor vermelha da carne, contribuir para o sabor da carne curada, retardar a oxidação de gorduras e impedir a germinação de esporos de *Clostridium* spp. O açúcar tem pelo menos três papéis importantes na técnica de cura: a estabilização de cor, aroma e substrato para a fermentação láctica. Além disso, ele modera o forte sabor do cloreto de sódio. Xaropes de milho, melaços ou mel podem ser adicionados para conferir sabor (Meats, 2005).

Existem dois tipos de cura, a primeira é denominada de cura a seco, é o método mais antigo e constitui na aplicação dos agentes de cura na forma seca sobre a superfície da carne e é um processo lento. A segunda é denominada cura de pickles ou por imersão em salmoura, na qual os ingredientes da cura são adicionados à água para formar uma salmoura e as peças são submersas nesta solução. Este método de cura também é lento e

necessita muito tempo para a salmoura se difundir por todo produto (Roça, 2008).

2.2.1 – Morcilha

A morcilha, do espanhol "morcilla", também chamada "morcela" ou "chouriço", é constituída por uma mistura de sangue bovino, gordura de porco e peles, sal, cebola e especiarias embutida em tripa natural ou sintética, amarrada manualmente e imersa em um banho de água quente a 90 °C. Existem muitas variedades desta iguaria em toda Península Ibérica e na América Latina. Segundo o filósofo grego Platão (Mithaicos, 428 a.C.), a morcilha foi inventada pelo grego Aftónitas. A primeira descrição deste tipo de embutido na culinária espanhola vem de Ruperto de Nola (um renomado chefe de cozinha catalão e escritor de livros de receitas) na cidade de Toledo no ano de 1525 (Luján, 1994).

Em Portugal é um prato típico, sendo possível encontrá-lo em diversas regiões. A morcilha confeccionada na região da Guarda é reconhecida como tendo grande qualidade, assim como as de Açores e de Portalegre. Inclui pedaços de carne entremeada, ligados com sangue de porco, que lhe conferem uma cor escura. É temperada com diversas especiarias, contando-se entre elas os cominhos e o cravinho, que conferem uma grande intensidade ao seu sabor. Pode ser servida assada, cozida ou fria. É frequentemente utilizada como complemento ao cozido à portuguesa, às favas com chouriço e à feijoada. Podem ainda distinguir-se alguns subtipos de morcilha, tais como a morcilha preta e morcilha branca. A morcilha preta é uma mistura feita com sangue que é colhido no abate do animal (geralmente suínos), cozida e

temperada com temperos verdes e especiarias e então embutida, geralmente nas tripas do próprio animal e depois cozidas em água fervente. A morcilha branca é feita de miúdos dos suínos (fígado, rins, coração) e demais carnes menos nobres, como pele, cabeça, língua, queixo e torresmos moídos. Estas carnes, exceto o torresmo, são cozidas em água, após são trituradas, salgadas e temperadas com temperos verdes e pimenta do reino. A morcilha doce é temperada com pimentão e a morcilha de farinha ligada com farinhas diversas (Dorigon & Renk, 2010). A morcilha foi trazida até o Brasil já nos primeiros tempos da colonização por portugueses e espanhóis, e é muito popular no Sul do país, na Argentina e no Uruguai.

A composição química da morcilha é 15% de proteínas, 32% de gordura, 1% de carboidratos e 52% de água e o pH em torno de 6,2 (Oteiza et al., 2003). Esta composição é adequada para a sobrevivência de alguns microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* (Brasil, 2001). No que diz respeito aos padrões microbiológicos para este produto, a legislação atual (Brasil, 2001) permite limites de até 10^3 UFC/g para Coliformes Termotolerantes e 5×10^2 UFC/g de Clostrídios Sulfito Redutores, bem como exige a ausência de *Salmonella* spp em 25g do produto.

Os embutidos, como muitos outros produtos alimentares, são originariamente contaminados por uma gama de gêneros microbianos. Os principais grupos de microrganismos saprófitas existentes nos embutidos são microrganismos mesófilos, microrganismos halotolerantes, cocos Gram positivos, catalase positivos, bactérias ácido-lácticas, bolores e leveduras

(Vasilopoulos et al., 2008). Liepe (1983) afirma que é impossível obter um embutido a partir de uma mistura de carne, sal e outros aditivos, sem a presença de uma microbiota inicial. Alimentos chamados culturais ou regionais, como a morcilha, podem conter um grande número de microrganismos, uma vez que consistem de miudezas e outros elementos, como pés e orelhas de porco, que estão em contato direto com a microbiota do animal e não recebem muita atenção durante o abate e processamento (Meats, 2005). Um estudo conduzido por van Holy et al. (1992), em salsichas tipo Viena, revelou a presença de uma diversidade de bactérias Gram positivas e negativas, tendo sido obtidos isolados de *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Um estudo realizado por Stewart (1983) encontrou uma contagem total de aeróbios em placas de 7,92 log/g para tripas (intestinos de porco), 7,51 log/g em *maws* (especiaria a base de estômagos de porcos) e 7,32 log/g em patês de fígado. Para *S. aureus* foram encontrados números de 5,18 log/g para tripas, 5,70 log/g para *maws* e 5,15 log/g para patês de fígado.

A fonte e diversidade de microrganismos que coloniza os embutidos dependem das técnicas e condições de fabricação, uma vez que o tempo, o tipo e a temperatura dos diferentes processos a que os embutidos estão sujeitos influenciam significativamente a população microbiana do produto final (Samelis et al. 1994). O método físico de imersão das morcilhas em água quente é empregado com o objetivo de reduzir ou eliminar formas vegetativas de psicotróficos e mesófilos, no entanto, um pós-tratamento pode contribuir para a contaminação bacteriana através de equipamentos, utensílios ou

manipuladores com falta de higiene pessoal (Silva, 1996). Um estudo conduzido por Adesiyun & Benjamin (1996) no qual foi analisada a linha de produção de morcilhas, foi constatado que a temperatura da água de imersão não se mantinha estável, o que não garantia a segurança do processo, uma vez que a diferença entre a temperatura interna do embutido e da água variou em 20 °C. Segundo os autores essa variação não permitiu que todas as unidades produzidas atingissem 70 °C em seu interior. Em embutidos curados por imersão em que a temperatura interna não atinge 70 °C (tais como presuntos cozidos ou salsichas) existe o risco da não eliminação de bactérias patogênicas, podendo haver, também, riscos maiores de contaminação pós-processamento por *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Nørrung et al., 2009).

2.3 – O Gênero *Staphylococcus*

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* que inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus* (Holt, 1994). Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Apresentam diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 µm, são imóveis e não formadores de esporos. Possuem metabolismo fermentativo e respiratório, neste último, vindo a produzir catalase (Varnan & Evans, 1991; Bannerman & Peacock, 2007).

Staphylococcus spp. possuem uma distribuição ubiqüitária na natureza, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região nasofaríngea de mamíferos e aves (Atanassova et al., 2001). Este gênero coloniza, prontamente, a pele e superfície de mucosas e

produzem inúmeros fatores de virulência que promovem sua sobrevivência e consequente disseminação (Poindexter & Schlievert, 1986; Fleischer, 1991). Segundo LBSN (2011), o gênero *Staphylococcus* é composto por 45 espécies divididas em dois grupos baseado na habilidade de coagular plasma de coelho: Estafilococos Coagulase Positivo (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativo (ECoN).

Os estafilococos secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (α , β , γ e δ), nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e collagenases (Dinges et al., 2000), além de outras enzimas como catalase, fibrolisina, coagulase e β -lactamase (Spicer, 2002). A expressão destas enzimas e citotoxinas são encontradas nos elementos genéticos como plasmídeos, transposons e profagos (Novick et al., 2001).

2.3.1 – Estafilococos coagulase positivo

A atividade de coagulase é o principal critério utilizado por laboratórios de microbiologia para a identificação das bactérias do grupo ECoP. De acordo com Madigan et al. (2004) o coágulo produzido pela atividade da enzima coagulase faz com que haja um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada, que dificulta o acesso dos mecanismos de defesas do hospedeiro. O coágulo ajuda a impedir a fagocitose fazendo com que os leucócitos não consigam penetrar adequadamente nos coágulos de fibrina (Schaechter et al., 2002).

Este grupo é composto por 6 espécies, dentre estas, destaca-se o *S. aureus* como a espécie mais prevalente em doenças em seres humanos (Koneman et al., 2001). A espécie é a causadora de infecções cutâneas como

furunculoses, impetigo e abscessos (Murray et al., 2000), infecções orgânicas incluindo osteomielites, endocardites e artrites (Spicer, 2002), síndrome da pele escaldada (Ladhani et al., 1999) e síndrome do choque tóxico (Dinges et al., 2000). O *S. aureus* também é frequentemente responsável por surtos de intoxicação alimentar, por ter a capacidade de expressar sete diferentes toxinas, no entanto outros ECoP, como *S. intermedius* e *S. hyicus*, podem também expressar toxinas enterotoxigênicas (Balaban & Rasooly, 2000; Veras et al., 2003).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou para os Estados Unidos da América (EUA) 185.000 casos/ano de surtos causados por ECoP (Mead et al., 1999). No Brasil entre os anos de 1999 a 2009 foram registrados 6.349 surtos de DTAs envolvendo 123.917 pacientes e 20,5 % dos casos foram causados por *Staphylococcus* spp. (Brasil, 2009). Gelli et al. (1999) observaram 776 surtos no estado de São Paulo entre 1994 e 1998 e em 51,54 % destes, o agente causador foi identificado como *S. aureus*. No estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 a 2005 foram notificados 1.275 surtos, dos quais a *Salmonella* spp foi responsável por 64,2% destes surtos e, em segundo lugar, o *S. aureus* com 11,7% (Brasil, 2009).

2.3.1.1 O gene da coagulase (*coa*) e seu polimorfismo

A estafilocoagulase é uma enzima extracelular cuja expressão é controlada pelo gene da coagulase (*coa*). A amplificação do gene *coa* é considerada um método simples e preciso para identificar e discriminar cepas de *S. aureus* (Goh et al., 1992; Schwarzkop & Karch 1994; Aarestrup et al., 1995; Schlegelova et al., 2003). Porém, existem numerosas formas alélicas

deste gene e cada isolado pode produzir uma ou mais variantes desta enzima (Henderson & Brodie, 1963; Reeves et al., 1981; Jeljaszewicz et al., 1983; Iandolo, 1990). A análise das sequências de DNA de genes da coagulase clonados a partir de três cepas diferentes de *S. aureus* revelou a presença de sequências variáveis dentro da região 3' codificadora do gene (Kaida et al., 1987; Kaida et al., 1989; Phonimdaeng et al., 1990). Esta região contém uma série de sequências repetidas (sequências tandem) de 81 pb, cujo número varia entre as linhagens e, por digestão do produto amplificado do gene com a enzima de restrição *AluI*, é possível discriminar entre isolados de *S. aureus* pela técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) da região 3' do gene. Embora as sequências destas repetições sejam bem conservadas, elas diferem, individualmente, na presença ou ausência de um sítio de restrição para *AluI* (Kaida et al., 1987; Kaida et al., 1989; Phonimdaeng et al., 1990) (Figura 1).

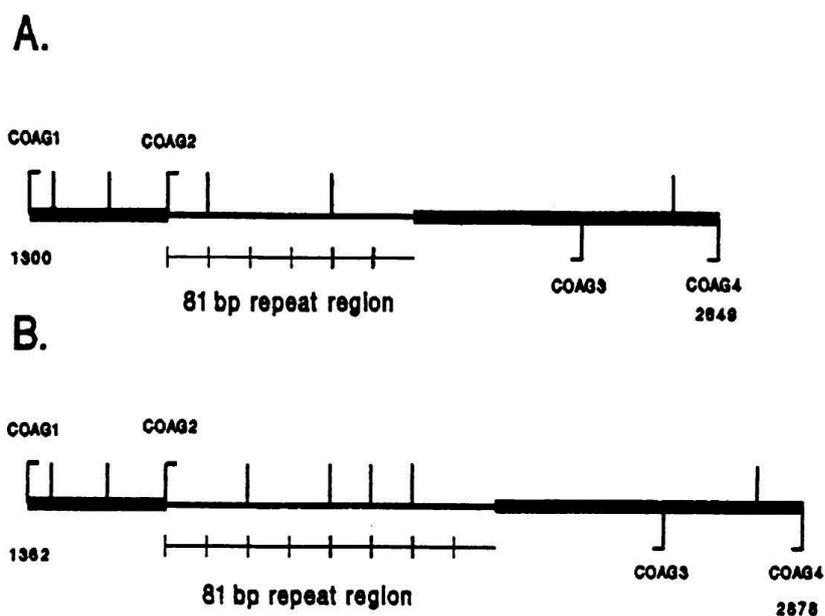


FIGURA 1. Comparação da localização dos sítios de restrição da enzima *AluI* dentro do gene da coagulase de duas cepas de *Staphylococcus aureus* A e B. Barras verticais: sítios de reconhecimento da enzima restrição *AluI*; linhas verticais: áreas variáveis contendo sequências repetidas de 81 pb. (Goh et al., 1992).

Analisando a figura é possível perceber que as cepas A e B apresentam 6 e 8 sequências repetidas, respectivamente. Esta variação faz com que cepas de uma mesma espécie apresentem tamanhos e perfis de restrição diferentes para o gene *coa*. Com base nessas observações, se supôs que diferentes isolados de *S. aureus* poderiam ser diferenciados devido a estas variações do gene da coagulase. As análises por PCR e PCR-RFLP da extremidade 3' do gene *coa* tem sido proposta como método de tipagem de isolados *S. aureus* para estudos epidemiológicos (Moon et al., 2007) e fornecido informações epidemiológicas detalhadas sobre esta espécie como o auxílio na identificação de clones causadores de infecções nosocomiais (Schwarzkop e Karch, 1994; Hookey et al., 1998).

Nos últimos anos, a análise do gene *coa* tem sido utilizada para a tipagem de *S. aureus* isolados de mastite bovina (Aarestrup et al., 1995; Lange et al., 1999; Su et al., 1999; Schlegelova et al., 2003; Aslantas et al., 2007; Moon et al., 2007) e isolados de mastite em cabras (da Silva et al., 2006), bem como em isolados *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e sensíveis à meticilina (MSSA) de diferentes espécimes clínicos, como pus, sangue, escarro, secreção traqueal, urina e outros (Goh et al., 1992; Hookey et al., 1998; Himabindu et al., 2009). No entanto, não existem dados publicados sobre o uso desse método de tipagem para *S. aureus* isolados de morcilhas.

2.3.2 – Estafilococos coagulase negativo

Entre as espécies de ECoN, *S. epidermidis* é a mais prevalente e persistente na pele e membranas mucosas, *S. hominis* é a segunda mais frequente, enquanto que *S. saccharolyticus* é a única espécie anaeróbia estrita residente da microbiota da pele. Outras espécies de ECoN, menos frequentes e membros da população residente encontradas transitoriamente na pele são *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. lugudunensis* e *S. cohnii*. Existem espécies localizadas em nichos específicos como o *S. capitis* (cabeça), *S. auricularis* (canal auditivo) e *S. saprophyticus* (geniturinário) (Cordeiro, 2007).

Por outro lado, as espécies *S. carnosus* e *S. equorum* desempenham um papel importante como componente natural da microbiota de humanos e animais, bem como de alimentos. Por este motivo, são considerados importantes nos processos de fabricação de vários produtos derivados de carnes, especialmente salames, onde são usados como culturas *starter* atuando como iniciadores de fermentação para garantir a qualidade e

segurança do produto final (Place et al., 2003; Corbière Morot-Bizot et al., 2007; Leroy et al., 2010).

Dentre as espécies descritas aqui, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* são as mais frequentemente isoladas de amostras clínicas (Piette & Verschraegen, 2008). A conversão destes microrganismos de simbiote a patógeno humano tem sido um reflexo direto do uso de implantes médicos invasivos e cateteres. De modo que, ao romper a barreira física (pele) os microrganismos saprofiticos atingirão a corrente sanguínea e os tecidos, onde poderão causar patologias. Este grupo é responsável por infecções no trato urinário, feridas, septicemias e endocardites em indivíduos imunocompetentes e, dentro do grupo, *S. saprophyticus* é a espécie mais prevalente (Rogers et al., 2009).

A incidência de infecções hospitalares causadas por ECoN tem aumentado nos últimos anos. Nos EUA, cerca de 30 % de todas as infecções nosocomiais da corrente sanguínea são causadas por ECoN (Piette & Verschraegen, 2008). No Brasil, entre os anos de 1997 a 2001 os ECoN foram responsáveis por 10% a 20% das infecções da corrente sanguínea (Sader et al., 2004). De junho de 2006 a maio de 2007 as sepses hospitalares por ECoN corresponderam a 23% do total notificado (Pereira et al., 2007). Em um estudo feito com ECoN isolados de bacteremia em um hospital escola foram encontrados dentre as espécies prevalentes *S. epidermidis* (67%), *S. haemolyticus* (20%), *Staphylococcus* spp. (11%) e *S. hominis* (2%) (Rigatti et al., 2010).

2.4 – Resistência antimicrobiana

Diferente do que acontece nos casos de infecção alimentar, os antimicrobianos não têm nenhum valor no tratamento de um paciente que sofre de intoxicação alimentar. Porém, podem representar uma possível ameaça, porque bactérias resistentes aos antimicrobianos podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio de alimentos contaminados e transferir os genes de resistência às bactérias da microbiota indígena ou potencialmente patogênicas do trato gastrointestinal dos seres humanos (Teuber, 1999; Witte, 2000).

A evolução e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos são o resultado da pressão seletiva imposta pelo homem, seja pela prescrição necessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido, automedicação, desperdício de restos de antimicrobianos no meio ambiente e emprego desses fármacos como promotor de crescimento em animais de produção (Tavares, 2000). O uso extensivo e muitas vezes indiscriminado de agentes antimicrobianos na produção animal e medicina animal tem um efeito seletivo sobre o surgimento e manutenção de bactérias resistentes e contribuiu para o aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Lyon & Skurray, 1987).

Os genes de resistência antimicrobiana podem ser carreados pelo cromossomo bacteriano, plasmídeos ou transposons. Estudos demonstrando a transferência de genes de resistências antimicrobiana de microrganismos veiculados por alimentos, animais ou pelo ambiente para seres humanos têm sido documentado (Doyle et al., 2006; Muhammad et al., 1993). Estafilococos

resistentes a antimicrobianos têm sido isolados de amostras de alimentos e animais, plantas de processamento de aves, carcaça de frango, leite (caprino, bovino e ovino), laticínios (Perreten et al., 1998; Khan et al., 2000; Werckenthin et al., 2001, Freitas et al., 2004;. Moroni et al., 2004;. Rapini et al., 2004; Scherrer et al., 2004; Huys et al., 2005; Normanno et al., 2007; Sawant et al., 2009). No entanto, nenhum estudo avaliou o perfil de resistência aos antimicrobianos em estafilococos isolados de morcilhas.

O antibiograma tem sido um método útil de tipagem bacteriana, contribuindo na investigação de fontes de contaminação, sendo a técnica amplamente disponível e padronizada e podendo ser utilizada com várias espécies microbianas (Arbeit, 1999). Sua principal desvantagem consiste na variabilidade da expressão da resistência, a instabilidade devido à transmissão horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos (Montesinos et al., 2002).

2.5 – Gastroenterite estafilocócica

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) foi estudada pela primeira vez em 1894 por J. Denys e posteriormente por M.A. Barber em 1914, que reproduziu em si mesmo os efeitos e sintomas da doença por meio do consumo de leite inoculado com uma cultura de *S. aureus*. A capacidade de algumas linhagens de *S. aureus* de causar a doença alimentar foi comprovada de forma conclusiva por G.M. Dack em 1930, que observou que os sintomas surgiam após a ingestão de culturas filtradas de *S. aureus* (Jay, 2005).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas. Estima-se que de 1.000 a

100 ng sejam quantidades eficientes de toxina para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (Bergdool, 1990). Foi relatado um surto causado por uma enterotoxina presente em achocolatados em uma escola nos EUA, onde a quantidade de toxina detectada foi de apenas 0,5 ng/mL (Evenson et al., 1998). Para que ocorra a produção mínima de enterotoxina no alimento é necessário que haja condições adequadas de temperatura e pH para a multiplicação dos estafilococos até a contagens de 10^5 UFC/g de alimento (Mossel & Garcia, 1975). No entanto, Carmo & Bergdool (1990) e Cunha Neto (1999) detectaram a presença de enterotoxinas entre uma contagem de 10^4 a 10^8 UFC/g e 10^2 a 10^4 UFC/g, respectivamente.

A IAE é a segunda doença veiculada por alimentos mais notificada e se caracteriza clinicamente por náuseas, vômitos, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Podendo resultar em desidratação decorrente da perda significativa de líquidos, sudorese e cefaléia, geralmente não é acompanhada de febre. Os sintomas começam a se manifestar aproximadamente 4 horas após o consumo do alimento contaminado com a toxina (Casman, 1965; Murray et al., 2000; Atanassova et al., 2001). Sua alta incidência se dá através de insuficientes processos de pasteurização ou descontaminação da matéria-prima originalmente contaminada ou pela contaminação durante a preparação e manipulação por portadores sadios (Scherrer et al., 2004).

2.6 – Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (*staphylococcal enterotoxin* - SE) são produzidas predominantemente por *S. aureus*. No entanto, outras espécies

de ECoP, incluindo *S. intermedius* e *S. hyicus* têm sido apontadas como enterotoxigênicas (Sena, 2000), bem como espécies de ECoN (Rapini et al., 2003). A presença de cepas produtoras de toxinas em ECoN é rara, entretanto cepas enterotoxigênicas, já foram isoladas de mãos dos manipuladores de alimentos, demonstrando sua importância para a saúde pública (Udo et al, 1999; Sena, 2000).

As SEs são geralmente classificadas como superantígenos (SAg) devido a capacidade de estimular grandes populações de células T, levando a uma superprodução de citocinas (Choi et al., 1989; Balaban & Rasooly, 2000). Pertencem à família denominada Toxinas Pirogênicas, originadas de espécies de estafilococos e estreptococos. Nesta família, também estão incluídas toxinas que apresentam determinadas estruturas, funções e sequências de nucleotídeos similares, como a TSST-1, as toxinas esfoliativas tipos A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) (Balaban & Rasooly, 2000), e compartilham outras propriedades importantes que incluem a capacidade de induzir vômitos e gastroenterite (Schad et al., 1997).

Até o momento, já foram descritos pelo menos 20 superantígenos sorologicamente distintos e a toxina do choque tóxico-1 (TSST-1). As SE são classificadas em cinco tipos clássicos sorológicos: SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE, porém outras enterotoxinas foram descritas recentemente na literatura, incluindo SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU, cujos genes correspondentes são descritos na literatura (Blaiotta et al., 2004b; Omoe et al., 2005). A relação entre a presença destas últimas

enterotoxinas e intoxicações alimentares ainda não é totalmente esclarecida (Omoe et al., 2002), exceto para SEG, SEH e SEI (Mclauchlin et al., 2000).

Superantígenos bacterianos são capazes de ativarem células T não específicas pela ligação externa com o domínio βV dos Receptores de células T (TCR) e à cadeia α da molécula de MCH de classe II com antígenos previamente transformados (Figura 2).

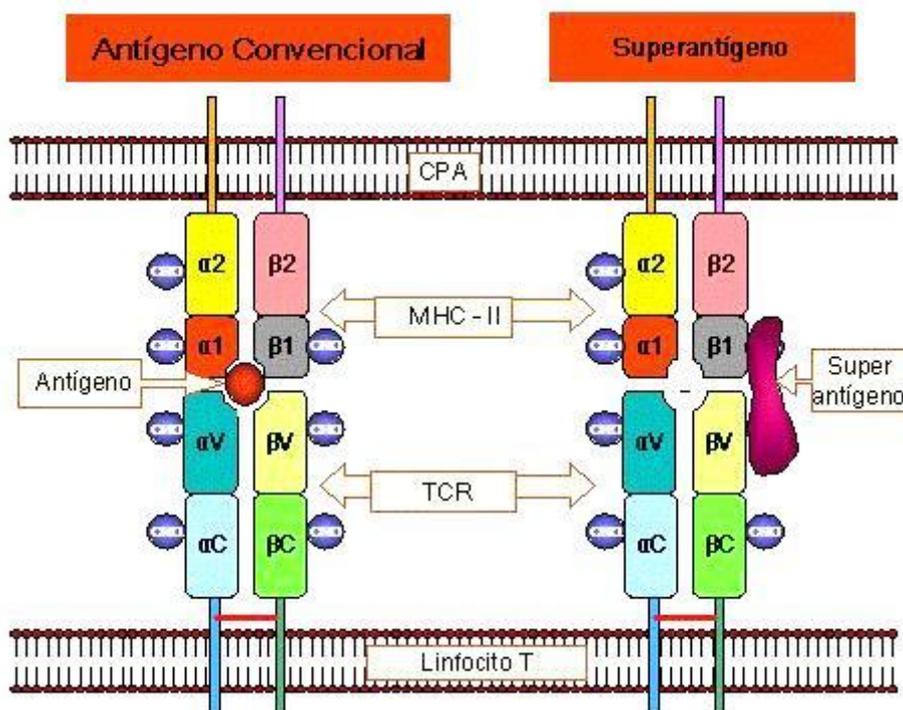


FIGURA 2: Exemplos de ligações de antígenos convencionais e superantígenos com Receptores de Células T e MCH de classe II. Fonte: (http://epidemiologiamolecular.com/reconocimiento-del-antigeno-i/#_Toc222662842).

Esta ligação produz um sinal que induz a ativação e proliferação policlonal de, aproximadamente, 10-30 % do total de células T e células T-CD4+, constituindo a população dominante na resposta imune. Assim, ocorre uma grande produção de citocinas pós-inflamatórias a partir de células T (IFN- γ

e TNF- α) bem como IL-2 a partir de monócitos, incluindo IL-1 e TNF- α . A produção maciça de citocinas pós-inflamatória desencadeia uma resposta inflamatória intensa, causando danos aos tecidos do hospedeiro (Shultz & Raij, 1992).

Estas toxinas são produzidas *in vitro* durante o final da fase de crescimento exponencial e começo da fase estacionária (Dinges et al., 2000; Betley et al., 1984; Betley et al., 1992). As enterotoxinas são resistentes à hidrólise por proteases gastrintestinais, incluindo a pepsina, a tripsina, renina, papaína e proteases jejunais (Bergdoll, 1971; Hui, et al., 1994; Schad et al., 1997) o que permite sua passagem através do trato gastrintestinal sem perder a atividade, além de apresentarem uma notável capacidade de resistência ao calor. A termoestabilidade foi observada após aquecimento a 100 °C durante 30 minutos (Murray et al., 2000) e sob temperaturas de pasteurização lenta e rápida (Franco e Landgraff, 2005; Silva Júnior, 2002), verificou-se também que as atividades biológicas das SEs permanecem inalteradas mesmo após o processamento térmico usual dos alimentos (Holecková et al., 2002). Portanto, elas não são totalmente desnaturadas pelo cozimento de alimentos contaminados possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar no homem.

A maioria dos genes codificadores para SEs estão localizados no cromossomo, em elementos extra-comossomais como plasmídeos, bacteriófagos, transposons ou ilhas de patogenicidade (Macmicking, 1995; Lindsay et al., 1998; Zhang et al., 1998). A transferência horizontal entre cepas não é rara, um recente estudo mostrou que isolados de *S. aureus* obtidos de

três diferentes hospitais tinham um ou mais genes de enterotoxinas e o número médio de genes por isolados foi de cinco, mas alguns apresentaram até 12 genes (Varshney et al., 2009).

2.6.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas

Diferentes genes codificadores já foram estudados e suas denominações iniciam com as letras *se* (*staphylococcal enterotoxin*). Os genes *sed* e *sej* foram descritos por serem carregados por plasmídeos (Bayles & landolo, 1989; Zhang et al., 1998); os *sea* e *see* por profagos (Couch et al., 1988; Betley et al., 1984; Betley & Mekalanos, 1988); os genes *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sen*, e *seo* presentes no cromossomo (Jarraud et al., 2001; Letertre et al., 2003) e os genes *sel* e *sek* em ilhas de patogenicidade (Fitzgerald et al., 2001). O gene *seb* já foi encontrado no cromossomo, em plasmídeos e em transposons (Shalita et al., 1977; Shafer & landolo, 1978b).

As SE são proteínas globulares solúveis em água, monoméricas com peso molecular de 26 a 29 KDa. São ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico e apresentam cisteínas formando pontes dissulfeto (Bergdoll et al., 1981; Prevost et al., 1995; Osterlund et al., 2002). Elas foram divididas em grupos por identidade gênica com base em sequências de aminoácidos. As SEA, SED e SEE compartilham de 53 a 81 % de identidade, entre SEB e SEC a identidade é de 50 a 66 %.

A SEA é expressa na fase estacionária de crescimento (Schad et al., 1997). A detecção do gene *sea* em linhagens de *S. aureus* é importante, visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (Evenson et al., 1998). O gene *sea* é composto por 771 pares de base (pb) e codifica uma proteína precursora

com 257 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 27,1 KDa (Betley & Mekalanos, 1988).

De acordo com Holecková et al. (2002) SEB é a principal enterotoxina produzida por *Staphylococcus* spp. isolados de queijos fabricados com leite de ovelha. O gene *seb* consiste de 798 pb que codifica uma proteína com 266 aminoácidos e peso molecular de 31, 4 KDa (Johns & Khan, 1988).

SEC é um grupo de proteínas altamente conservadas de origem cromossômica, que apresentam três subtipos distintos: SEC₁, SEC₂ e SEC₃, com base nas diferenças entre os determinantes antigênicos (Marrack & Kappler, 1990). Outras variações moleculares têm sido descritas de acordo com o animal hospedeiro ao qual estão vinculados, SEC_{bovina}, SEC_{canina}, SEC_{ovina} (Marr et al., 1993). De um total de 39 enterotoxinas SECs produzidas por cepas de *S. aureus*, 26 foram responsáveis por 20 surtos de intoxicação alimentar no centro de Taiwan, 12 pertencentes ao subtipo SEC₂ e 13 ao subtipo SEC₃ e apenas uma pertencia ao subtipo SEC₁. Isto demonstra que SEC₂ e SEC₃ neste país são os subtipos mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (Chen et al., 2001). Estudando 100 cepas de *S. aureus* isolados de casos de mastite nos estados do Ceará e Rio de Janeiro (36 de origem bovina e 64 de origem caprina), Silva et al. (2005) observaram a presença do gene *sec* em 31 % e 86 % dos isolados bovinos e caprinos, respectivamente. Segundo Wilson et al. (1991), as SECs estão comumente associadas ao leite e produtos derivados provenientes de bovinos, ovinos e caprinos.

O gene *sec1* contém 801 pb e codifica uma proteína madura com 239 aminoácidos e 27,4 KDa (Bohach & Schlievert, 1987). O gene *sec2* também contém 801 pb e codifica uma proteína madura com 239 aminoácidos e 26,0 KDa (Bohach & Schlievert, 1989). O gene *sec3* contém 798 pb e codifica uma proteína madura com 238 aminoácidos e 27,4 KDa (Couch & Betley, 1989).

De acordo com Casman et al. (1967), SED é comumente produzida por linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite e alimentos congelados, enquadrando-se como a segunda SEs mais encontrada, depois da SEA, em intoxicações alimentares. A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade de enterotoxina (100 a 200 ng) é necessária para causar a doença, especialmente em crianças e idosos (Kokan & Bergdool, 1987). O gene *sed* foi localizado no plasmídeo que codifica a penicilinase, tem 27,6 kb e codifica uma proteína com 228 aminoácidos, com peso molecular de 26,3 KDa (Bayles & landolo, 1989).

O gene para SEE (*see*) codifica uma proteína de 29 KDa (Couch et al., 1988) que apresenta homologia com a SEA e SED (Balaban & Rasooly, 2000).

2.7 – Legislação brasileira para alimentos

Segundo o Ministério da Saúde através da RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001), as DTAs são causadas pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina produzida por ele, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico.

Os valores estabelecidos para os padrões microbiológicos de cada grupo de alimento que constam no Anexo I da Resolução não se aplicam para o diagnóstico de caso/surto de DTA. A enumeração de ECoP tem por objetivo substituir a determinação de *S. aureus*, uma vez que este critério consta como “Estaf. Coag. Positiva”. Consta no Anexo I desta RDC, no item 5 (Carnes e Produtos Cárneos) subitem 5.i os níveis aceitáveis de contaminação por ECoP para: Produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros) e produtos a base de sangue e derivados processados. Para este grupo o limite tolerado é de 3×10^3 UFC/gr. A determinação da capacidade de produção de toxinas, quando necessário, pode ser realizada a fim de obter dados de interesse à saúde pública (Brasil, 2001).

Sabe-se que um dos principais indicadores de patogenicidade de estafilococos é o teste da coagulase e as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas predominantemente por *S. aureus*. Contudo, alguns autores isolaram ECoN enterotoxigênicos das mãos de manipuladores de alimentos (Udo et al., 1999; Sena, 2000). Estes resultados trazem reflexos importantes para a saúde pública, visto que a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase positivas (Brasil, 2001).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Coleta das amostras

Foram analisadas dez amostras de morcilhas preta e dez de morcilhas branca comercializadas no Mercado Público da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. As coletas, realizadas entre os meses de Setembro a Novembro de 2008, foram feitas uma vez por semana em 2 bancas locadas no Mercado Público, sem notificação da fonte distribuidora do produto. Em cada coleta foram adquiridas 1 porção de morcilha preta e 1 porção de morcilha branca – simulando uma condição real de consumo – envoltas em sacolas plásticas de uso próprio da banca. As amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Ensaio e Análise de Alimentos (LEAN) da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

3.1.1 – Isolamento de *Staphylococcus* spp..

Em trabalho prévio foram realizadas contagens de Coliformes Termotolerantes, Estafilococos Coagulase Positivo e Clostrídios Sulfito Redutores e investigada a presença de *Salmonella* sp., conforme a Resolução RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) (anexo 1), que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos. Para a realização das análises foram

seguidas as recomendações do *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 1998). Para a realização das análises, a pele que envolve as morcilhas foi retirada, uma vez que, a mesma é também retirada para o consumo.

Como resultado destas análises, o único quesito que se encontrou fora dos padrões microbiológicos estabelecidos, foi a contagem de estafilococos coagulase positivo, que variou entre $3,2 \times 10^3$ a $4,1 \times 10^5$ UFC/g para as morcilhas preta (Miranda et al, 2009) e entre $5,7 \times 10^3$ a $8,2 \times 10^5$ UFC/g para as morcilhas branca (dados não publicados).

Frente aos resultados encontrados, foram selecionadas dez colônias aleatórias típicas e não típicas de ECoP de cada amostra em ágar Baird-Parker (Merck), totalizando 200 isolados. As colônias foram mantidas congeladas (-20 °C) em meio Molico® (Nestlé) acrescido de 10 % de glicerol para análises posteriores.

3.2 – Reativação de amostras

Para reativação bacteriana, uma pequena alíquota da cultura foi inoculada, com auxílio de alça estéril, em ágar Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI, Difco) e incubada a 37 °C por 24 h. As colônias foram utilizadas para os testes bioquímicos e extração de DNA total.

3.3 – Provas bioquímicas

3.3.1 – Teste de fermentação em ágar sal manitol

Este meio de cultivo é caracterizado como seletivo e diferencial para estafilococos e é recomendado para isolamento de estafilococos patogênicos, uma vez que, segundo Koch (1942) e Chapman (1945), isolados sal manitol positivo a partir de amostras clínicas, alimentos, cosméticos e outros materiais

são sugestivos de *S. aureus*. Todos os isolados foram semeados em Ágar Sal Manitol (Himedia) e os isolados que apresentaram coloração amarela da colônia foram submetidos à caracterização bioquímica segundo o método proposto por Bannerman & Peacock (2007).

3.3.2 – Teste da catalase

Para detectar a presença da enzima catalase foi realizado o teste que determina a capacidade da enzima em decompor o peróxido de hidrogênio com formação de água e oxigênio molecular. Uma porção do crescimento bacteriano foi transferida para uma lâmina de vidro e posteriormente foi feita a adição de uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3 %. A ocorrência de borbulhamento imediato foi considerada teste positivo.

3.3.3 – Teste da coagulase em tubo

A presença da enzima extracelular estafilocagulase foi determinada pelo teste da coagulase em tubo (coagulase livre). Este ensaio detecta a capacidade da enzima de coagular o plasma sanguíneo através de um mecanismo similar ao da coagulação. A atividade da estafilocagulase foi determinada a partir da adição de uma suspensão de 500 µL do inóculo em caldo BHI a 500 µL de plasma de coelho (Laborclin), com posterior incubação a 37° C por 6 h. A formação de coágulos após 2, 4 ou 6 h de incubação foi interpretada como uma prova positiva e, a ausência de coagulação após 24 h de incubação, uma prova negativa.

3.3.4 – Teste de Voges-Proskauer (VP)

A semeadura em 1 mL de caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VM-VP Himedia) foi realizada com alça de platina e a incubação a

37 °C foi de 48 horas. Após a incubação, adicionou-se a cada tubo inoculado 3 gotas da Solução I do Reativo de Barritt [Alfa Naftol (6,0 mL), Álcool Etilico 95 % (100 mL q.s.p.)] seguido de agitação. Acrescentou-se mais 2 gotas da Solução II do Reativo de Barritt [Hidróxido de potássio (16,0 mL), Água destilada (100 mL q.s.p.)] seguido de agitação vigorosa e repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. A presença de um anel vermelho na superfície do caldo significou resultado positivo, devido à produção de acetoina, e sua ausência, resultado negativo.

3.3.5 – Teste de fermentação de açúcares

A utilização de açúcares como fonte de carbono produz quantidades variadas de substâncias orgânicas, dentre as quais se destacam ácidos que alteram o pH do meio de cultura. Para a determinação da capacidade de utilizar açúcares foi realizada a inoculação dos microrganismos em um meio contendo água peptonada, o indicador de pH púrpura de bromocresol e 1 % do açúcar a ser testado sob posterior incubação a 37 °C. Foi determinada a produção de ácido a partir dos açúcares L-arabinose, lactose, maltose e sacarose. A leitura foi realizada diariamente durante 5 dias. A alteração do indicador de púrpura para amarelo, evidenciando a mudança de pH, indicou fermentação dos referidos carboidratos e produção de ácidos.

3.3.6 – Controle de qualidade das provas de identificação

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas foram utilizadas como controles positivos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 19095.

3.4 – Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade dos isolados foi testada pelo método de disco-difusão em ágar (Bauer et al., 1966) de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008). Foram testados os seguintes antimicrobianos: eritromicina (ERI 15 µg), tetraciclina (TET 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), vancomicina (VAN 30 µg) e cloranfenicol (CLO 30µg). As placas foram inoculadas e o tamanho das zonas de inibição foi interpretado pelas normas do CSLI (2008). Os resultados desses testes foram registrados após 18-24 h de incubação a 35 ° C. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

3.5 – Extração de DNA total

Uma colônia foi semeada em 5 mL de caldo BHI (Difco) e incubada sob agitação a 37 °C por 16-18 h. A cultura foi centrifugada por 5 min a 18.000 X g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 3 vezes com 1 mL de tampão TE-1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM – pH 7,8) e ressuspenso em 100 µL do mesmo tampão. Foi adicionado 100 µL de tampão de lise [20 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH 7,4; 10 mM EDTA (Invitrogen), pH 8,0 e 200 mM NaCl (Nuclear); 100 µg de proteinase K (USB Corporation) e 1 % SDS (Promega)] e incubado, em banho, por 1 h a 55 °C. Posteriormente foi feita a extração padrão com fenol (Invitrogen) e precipitação com etanol (Pró-Análise) de acordo com protocolo de Sambrook & Russell (2001). O DNA foi tratado com 100 µg de RNase (Vivantis Technologies) e dissolvido em 100 µL TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0). A quantificação de DNA foi determinada em gel de agarose 1,0 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL

(Promega)] e comparado com quantidades conhecidas de lambda DNA (Fermentas).

Para a realização das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas quantidades de, aproximadamente, 20 ng de DNA.

3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene da coagulase (*coa*)

As amostras foram testadas para a presença de gene da coagulase (*coa*) utilizando o seguinte par de primers: COA-F (5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3') e COA-R (5'-GCT TGT TCC GAT TCG ATG C-3') (Hookey et al., 1998) que amplifica um fragmento de DNA de 840 bp.

As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 10 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56,7 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C. Cepas de *S. aureus* foram gentilmente cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e utilizadas como controles positivos (ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 23235, ATCC 25923 e ATCC 27664). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

3.6.1 – Detecção de Perfil de Polimorfismo por Restrição Enzimática (RFLP) do gene da coagulase

Os diferentes produtos de PCR com fragmentos variados foram digeridos com endonuclease de restrição *AluI* (New England Biolabs) para verificar a presença de polimorfismo nesta região. Aproximadamente 1 µg do produto da PCR foi digerido com 5 U da enzima *AluI*, em uma reação de 10 µL, a 37 °C por 2 h. Toda a reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose.

3.7 – Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA

Os isolados que não puderam ser identificados por classificação bioquímica em espécie ou foram classificados como coagulase negativo e apresentaram o gene *coa*, foram submetidos à amplificação, a partir do DNA genômico, do gene 16S rRNA por PCR utilizando os primers F-C27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e R-530 (5'-CCG CGG CTG CTG GCA CGT A-3') (Gontang et al., 2007).

As reações foram otimizadas em 25 µL e continham 2 mM MgCl₂ (Invitrogen), 2,5 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 45 segundos a 72 °C; e 5 min a 72 °C. O produto de PCR esperado de 530 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

Os produtos foram purificados com KIT GFX® (GE Healthcare) para sequenciamento em sequenciador modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP6. Para a marcação foi utilizado o kit *Big Dye Terminator* v3.1 (Applied Biosystems). As sequencias de nucleotídeos foram analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A e D (*sea* e *sed*)

As amostras foram testadas para a presença dos genes *sea* e *sed* utilizando os pares de primers demonstrados na tabela 1. As reações das PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 10 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore) e as amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf).

3.9 – Multiplex PCR para detecção dos genes das enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*)

As amostras foram testadas para a presença dos genes da enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*) utilizando os pares de primers demonstrados na tabela 1. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore) e

as ampliações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf).

TABELA 1. Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp. utilizados no estudo.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5'- 3')	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Fragmento	Referências
sea ^a	F-SEA	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	54 °C	126 pb	Este estudo
	R-SEA	CTG AAC CTT CCC ATC AAA AAC			
seb ^b	F-SEB	GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	55 °C	475 pb	Este estudo
	R-SEB	TTC GCA TCA AAC TGA CAA ACG			
sec ^c	F-SEC	AGA ACT AGA CAT AAA AGC TAG G	55 °C	267 pb	Este estudo
	R-SEC	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC			
sed ^d	F-SED	TTT GGT AAT ATC TCC TTT AAA CG	55 °C	309 pb	Este estudo
	R-SED	CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC			
see ^e	F-SEE	CCT ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC	55 °C	173 pb	Este estudo
	R-SEE	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC			

Controles positivos *S. aureus*: ^aATCC 13565; ^bATCC 14458; ^cATCC 19095; ^dATCC 23235; ^eATCC 27664.

3.10 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação e digestão foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)] e comparado com marcador molecular de 50 pb e 100 pb Ladder (Invitrogen).

4 – RESULTADOS

4.1 – Espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de morcilhas artesanais

A partir dos 200 isolados obtidos em meio ágar Baird-Parker e semeados em Ágar Sal Manitol, 82 (41%) foram identificados como estafilococos manitol positivos (Tabela 2). Após a análise da atividade da catalase e coagulase nas amostras, estas foram divididas em dois grupos: 75,61 % (62/82) pertenciam ao grupo ECoN e 24,39 % (20/82) ao grupo ECoP.

Através da fermentação dos açúcares foi possível identificar quatro espécies do grupo ECoP: *Staphylococcus pseudintermedius* (6,10 %); *Staphylococcus aureus* (3,66 %); *Staphylococcus schleiferi* (1,22 %) e *Staphylococcus intermedius* (1,22 %) e cinco espécies do grupo ECoN: *Staphylococcus saprophyticus* (37,80 %); *Staphylococcus carnosus* (15,85 %); *Staphylococcus vitulinus* (8,54 %); *Staphylococcus cohnii* (6,10 %) e *Staphylococcus equorum* (1,22 %). Dez isolados ECoP (12,20 %) e cinco isolados ECoN (6,10 %) não puderam ser identificados como espécie e foram identificados com *Staphylococcus* spp. (Tabela 2).

TABELA 2. Distribuição dos *Staphylococcus* spp. manitol positivos isolados a partir de morcilhas artesanais em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Fonte	Coagulase Fenótipo	Espécies	N° de isolados manitol positivos	
			n	(%)
Morcilha Branca	ECoN ^a	<i>S. saprophyticus</i>	21	(25,61)
		<i>S. carnosus</i>	5	(6,10)
		<i>S. vitulinus</i>	3	(3,66)
		<i>Staphylococcus</i> spp.	2	(2,44)
		<i>S. cohnii</i>	1	(1,22)
		<i>S. equorum</i>	1	(1,22)
	ECoP ^b	<i>Staphylococcus</i> spp.	3	(3,66)
Morcilha Preta	ECoN ^a	<i>S. saprophyticus</i>	10	(12,20)
		<i>S. carnosus</i>	8	(9,76)
		<i>S. cohnii</i>	4	(4,88)
		<i>S. vitulinus</i>	4	(4,88)
		<i>Staphylococcus</i> spp.	3	(3,66)
	ECoP ^b	<i>Staphylococcus</i> spp.	7	(8,54)
		<i>S. pseudointermedius</i>	5	(6,10)
		<i>S. aureus</i>	1	(1,22)
		<i>S. intermedius</i>	1	(1,22)
		<i>S. schleiferi</i>	1	(1,22)
Total			82	100

^aEstafilococos Coagulase Negativo. ^bEstafilococos Coagulase Positivo.

É notável que a prevalência de espécies do grupo ECoP na morcilha branca é 3 vezes menor que na morcilha preta. Este resultado pode ser atribuído aos ingredientes utilizados para o preparo das morcilhas, uma vez que a morcilha branca tem peles em sua composição. Sendo o grupo ECoN o componente principal da microbiota da pele, pode-se justificar sua presença em altos números, ganhando a competição com o grupo ECoP.

4.2 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana

A tabela 3 mostra o perfil de resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. frente aos 5 antimicrobianos testados. Trinta e nove isolados (47,56 %) apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos

testados e 43 isolados (52,44 %) foram sensíveis, de acordo com CLSI (CLSI, 2008).

TABELA 3. Distribuição da resistência e susceptibilidade antimicrobiana nos *Staphylococcus* spp. manitol positivo isolados de morcilhas artesanais.

Perfil Fenotípico Antimicrobiano^a	Espécie	n	(%)
TET/ERI	<i>Staphylococcus</i> spp.	2	(2,44)
	<i>S. saprophyticus</i>	2	(2,44)
	<i>S. aureus</i>	1	(1,22)
	<i>S. equorum</i>	1	(1,22)
	<i>S. vitulinus</i>	1	(1,22)
GEN/TET	<i>S. saprophyticus</i>	1	(1,22)
ERI/GEN	<i>S. cohnii</i>	2	(2,44)
	<i>S. vitulinus</i>	1	(1,22)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	(1,22)
CLO/ERI	<i>S. saprophyticus</i>	1	(1,22)
ERI	<i>S. saprophyticus</i>	3	(3,66)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	3	(3,66)
	<i>S. aureus</i>	1	(1,22)
	<i>S. cohnii</i>	1	(1,22)
	<i>S. schleiferi</i>	1	(1,22)
TET	<i>S. saprophyticus</i>	5	(6,10)
	<i>S. carnosus</i>	2	(2,44)
	<i>S. cohnii</i>	1	(1,22)
	<i>S. pseudointermedius</i>	1	(1,22)
	<i>S. vitulinus</i>	1	(1,22)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	(1,22)
GEN	<i>S. carnosus</i>	1	(1,22)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	(1,22)
CLO	<i>S. carnosus</i>	2	(2,44)
	<i>S. saprophyticus</i>	1	(1,22)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	(1,22)
Suscetíveis	<i>S. saprophyticus</i>	18	(21,95)
	<i>S. carnosus</i>	8	(9,76)
	<i>Staphylococcus</i> spp.	6	(7,32)
	<i>S. pseudointermedius</i>	4	(4,88)
	<i>S. vitulinus</i>	4	(4,88)
	<i>S. aureus</i>	1	(1,22)
	<i>S. cohnii</i>	1	(1,22)
<i>S. intermedius</i>	1	(1,22)	
TOTAL		82	100

^aAntimicrobianos: ERI: eritromicina, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, CLO: cloranfenicol.

Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina. Dentre os perfis encontrados, 21 (25,61 %), 19 (23,17 %), 7 (8,54 %) e 5 (6,1 %) apresentaram resistência a eritromicina, tetraciclina, gentamicina e cloranfenicol, respectivamente. Treze isolados (15,85 %) mostraram multirresistência, ou seja, resistência a pelo menos duas classes de antimicrobianos. O perfil de maior frequência observado foi eritromicina/tetraciclina.

O isolamento de estafilococos resistentes em morcilhas artesanais sugere uma situação de risco para a comunidade e também deve ser considerada uma possível correlação entre cepas presentes em hospitais com os isolados de alimentos.

4.3 – Frequência do gene coagulase (*coa*) e atividade da coagulase

A especificidade dos primers para frequência do gene da coagulase foi determinado primeiro nas cepas ATCC. Os fragmentos gerados de DNA amplificado pelo primer *coa* nas cepas controles variaram de 980 pb, 875 pb, 700 pb, 650 pb e 600 pb (Figura 3).

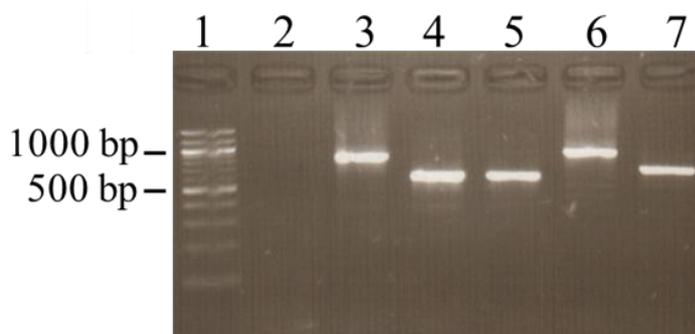


FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *coa* em *Staphylococcus aureus* representativos. Linha 1: Marcador de peso molecular 100 pb Ladder; Linha 2: controle negativo; Linha 3: ATCC 25923; Linha 4: ATCC 13565; Linha 5: ATCC 14458; Linha 6: ATCC 19095; Linha 7: ATCC 23235.

Do total de 82 isolados, 16 (19,51 %) apresentaram o gene da coagulase, destes 55,0 % (11/20) pertenciam ao grupo ECoP e 8,06 % (5/62) ECoN conforme atividade enzimática (Tabela 4). Dois isolados apresentaram fragmentos de 900 pb, quatro de 730 pb, um de 650 pb e nove de 550 pb.

TABELA 4. Análise genotípica e fenotípica do gene da coagulase em *Staphylococcus* spp. manitol positivos isolados de morcilhas artesanais.

Genótipo (PCR ^a)	Nº de isolados	Espécies	Fenótipo (Coagulase em tubo)	
900	1	<i>S. aureus</i>	ECoP ^b	
	1	<i>S. cohnii</i>		ECoN ^c
700	1	<i>S. aureus</i>	ECoP ^b	
	1	<i>S. aureus</i>	ECoP ^c	
	1	<i>Staphylococcus</i> spp.	ECoP ^b	
	1	<i>S. schleiferi</i>	ECoP ^b	
650	1	<i>S. vitulinus</i>		ECoN ^c
550	1	<i>Staphylococcus</i> spp.		ECoN ^c
	1	<i>S. pseudointermedius</i>	ECoP ^b	
	3	<i>S. pseudointermedius</i>	ECoP ^b	
	1	<i>S. intermedius</i>	ECoP ^b	
	1	<i>S. pseudointermedius</i>	ECoP ^b	
	2	<i>Staphylococcus</i> spp.		ECoN ^b
	9	<i>Staphylococcus</i> spp.	ECoP ^b	
Negativo	31	<i>S. saprophyticus</i>		ECoN ^c
	13	<i>S. carnosus</i>		ECoN ^c
	4	<i>S. cohnii</i>		ECoN ^c
	6	<i>S. vitulinus</i>		ECoN ^c
	1	<i>S. equorum</i>		ECoN ^c
	2	<i>Staphylococcus</i> spp.		ECoN ^c
Total	82		20	62

^aValores aproximados em pares de bases. ^bECoP: Estafilococos Coagulase Positivo. ^cECoN:

4.4 – Sequenciamento dos produtos da região 16S rRNA

Dos isolados ECoN que apresentaram o gene *coa* as espécies *S. cohnii* e *S. vitullinus* foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA

e as sequências nucleotídicas analisadas por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A análise revelou que *S. cohnii* apresentou 97% de identidade com *S. cohnii* (GenBank: HQ154559.1) e *S. vitullinus* 99% de identidade com *S. vitullinus* (GenBank: AM062694.1). Para o nosso conhecimento esta é a primeira vez que este gene é detectado em ECoN. Outros 4 isolados de *Staphylococcus* spp. foram sequenciados e 1 isolado apresentou 98% identidade com *S. aureus* (GenBank: FM207541.1) e 1 isolado apresentou 89% identidade com *S. equorum* (GenBank: DQ232735.1), para os demais não foi possível encontrar similaridade com nenhuma sequência depositada no banco de dados.

4.5 – Polimorfismo do gene *coa* por PCR- RFLP

Os fragmentos de DNAs foram submetidos à digestão com a enzima *A**l**u**I* para verificar a existência de polimorfismo nos fragmentos. Esta enzima reconhece seu sítio de restrição em uma das fitas de DNA e faz uma clivagem de extremidades cegas entre os nucleotídeos 5'...AG[▼]CT...3' e 3'...TC[▲]GA...5'. O perfil de restrição enzimática do gene *coa* das cepas controles ATCCs está demonstrado na Figura 4.

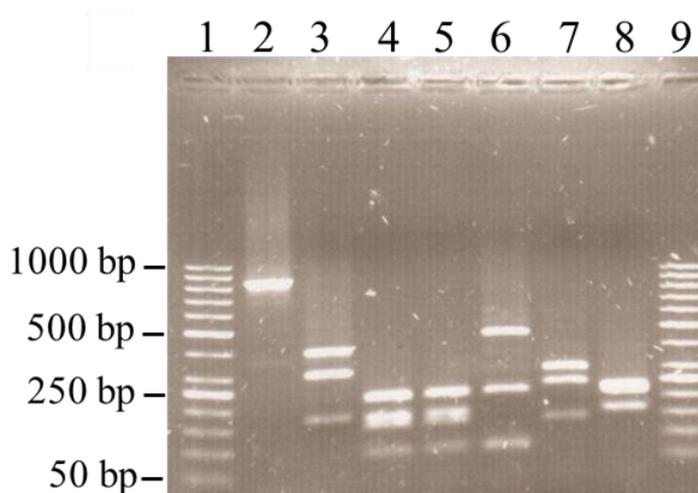


FIGURA 4. Digestão dos produtos de amplificação do gene *coa* com enzima de restrição *AluI* em *Staphylococcus aureus* representativos. Linhas 1 e 9: Marcador de peso molecular 50 pb Ladder; Linha 2: ATCC 25923 não clivado; Linha 3: ATCC 25923; Linha 4: ATCC 13565; Linha 5: ATCC 14458; Linha 6: ATCC 19095; Linha 7: ATCC 23235; Linha 8: ATCC 27664.

Após digestão enzimática com *AluI*, de 2 a 4 bandas foram obtidas dos fragmentos e foram observados 11 diferentes perfis (I ao XI) de restrição entre os isolados. Os perfis de restrição encontrados nos isolados de morcilhas estão demonstrado na Tabela 5.

O perfil IX foi mais prevalente (25%) entre os 16 isolados *coa* positivo. Os resultados aqui observados indicam uma heterogeneidade considerável no gene *coa* de isolados de estafilococos sal manitol positivos de morcilhas e o padrão de restrição do gene da coagulase não pode ser usado como um padrão para a identificação de isolados ou para agrupamentos de isolados conforme a fonte de amostra.

TABELA 5. Perfis de restrição enzimática do gene da coagulase em *Staphylococcus* spp. manitol positivos isolados de morcilhas artesanais, clivados com a enzima *AluI*.

PCR ^a	Genótipo		N° de isolados	Espécies
	Perfil	RFLP ^a		
900	I	400 - 300 – 180	1	<i>S. aureus</i>
	II	380 - 250 - 170 – 100	1	<i>S. cohnii</i>
700	III	400 - 220 – 80	1	<i>S. aureus</i>
	IV	300 - 220 – 180	1	<i>S. aureus</i>
	V	220 - 180 - 140 - 110 – 50	1	<i>Staphylococcus</i> spp.
650	VI	350 – 290	1	<i>S. vitulinus</i>
550	VII	400 – 130	1	<i>Staphylococcus</i> spp.
	VIII	380 – 180	1	<i>S. pseudointermedius</i>
	IX	380 - 140 – 30	3	<i>S. pseudointermedius</i>
			1	<i>S. intermedius</i>
	X	370 – 150	1	<i>S. pseudointermedius</i>
XI	350 - 150 – 50	2	<i>Staphylococcus</i> spp.	
Total			16	

^aValores aproximados em pares de bases.

4.6 – Prevalência e distribuição dos genes de enterotoxinas (se)

A especificidade dos primers desenhados no presente estudo para amplificar os genes de enterotoxinas (se) foi determinada primeiro nas cepas controles ATCCs. Os fragmentos de DNA esperados para os respectivos genes apresentados pelas cepas controles ATCC's estão demonstrados na figura 5. A cepa ATCC 13565 positiva para o gene sea originou um fragmento de DNA de 126 pb; ATCC 14458 para seb originou um fragmento de 475 pb, ATCC 19095 positiva para sec originou um fragmento de 276 pb, ATCC 23235 para sed originou um fragmento de 309 pb e ATCC 27664 para see originou um fragmento de 173 pb.

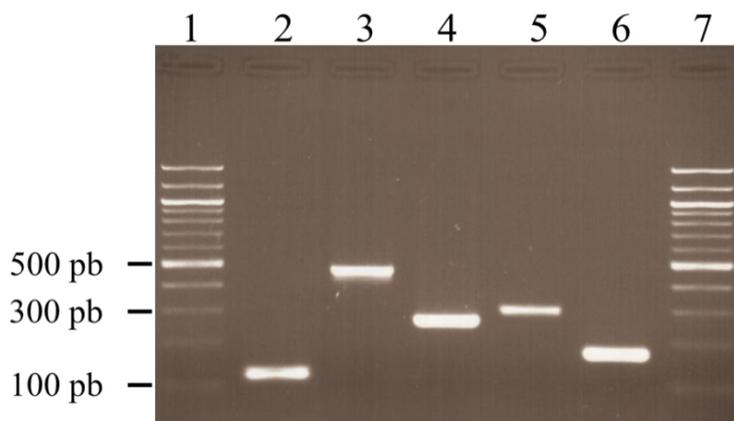


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação dos genes das enterotoxinas A, B, C, D e E em *Staphylococcus aureus* representativos. Linhas 1 e 7: Marcador de peso molecular 100 pb Ladder; Linha 2: sea (126 pb); Linha 3: seb (475 pb); Linha 4: sec (276 pb); Linha 5: sed (309 pb); Linha 6: see (173 pb).

A técnica de multiplex PCR (mPCR), que amplifica simultaneamente mais de um gene na mesma reação, tem sido descrita na literatura para detecção de estafilococos enterotoxigênicos em alimentos (Tamarapu et al., 2001; Rosec & Guiraud, 2002; Nájera-Sanchez et al., 2003; Kwon et al., 2004; Cremonesi et al., 2005; Hwang et al., 2007; Vancraeynest et al., 2007; Pelisser et al., 2009; Pereira et al., 2009; Ertas et al., 2010). No presente trabalho não foi possível a padronização dos cinco pares de primers para as enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) em uma mesma reação devido à temperatura de anelamento dos primers SEA e à inibição dos primers SED. Portanto, estas amplificações foram desenvolvidas em reações únicas. Por outro lado, os primers SEB, SEC e SEE demonstraram especificidade e sensibilidade quando submetidos a uma mesma reação.

Dos 82 isolados testados, 33 (40,24 %) foram positivas para um ou mais genes de enterotoxinas (Tabela 6).

TABELA 6. Distribuição dos genes de enterotoxinas em estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas artesanais.

Espécies	N° de Isolados	N° de Isolados positivos para presença dos genes se						
		SE ^c	sea	seb	sec	sed	see	
ECoN ^a	<i>S. saprophyticus</i>	31	10	2	4	1	1	3
	<i>S. carnosus</i>	13	7	2	1	4	0	0
	<i>S. vitulinus</i>	7	4	2	1	1	0	0
	<i>S. cohnii</i>	5	2	2	1	0	0	0
	Staphylococcus spp.	5	3	2	2	0	1	1
	<i>S. equorum</i>	1	1	0	0	1	0	0
ECoP ^b	Staphylococcus spp.	10	3	1	1	1	0	2
	<i>S. pseudointermedius</i>	5	2	1	1	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	3	0	0	0	0	0	0
	<i>S. intermedius</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>S. schleiferi</i>	1	1	0	0	0	0	1
Total	82	33	12	11	8	2	7	

^aECoN: Estafilococos Coagulase Negativo. ^bECoP: Estafilococos Coagulase Positivo. ^cNúmero de isolados que foram positivos para pelo menos 1 gene de enterotoxinas estafilocócicas (SE)

O gene sea foi o mais prevalente sendo observado em 14,63 % (12/82) entre os isolados, seguido de seb 13,41 % (11/82), sec 9,76 % (8/82) e see 8,54 % (7/82). O gene com menor prevalência foi o sed com apenas 2,44 % (2/82). Dos 62 isolados ECoN do estudo, 27 foram positivos para se (43,55 %) e dentro deste grupo a espécie *S. saprophyticus* foi a predominante com 37,04 % (10/27) seguida da espécie *S. carnosus* com 25,93 % (7/27). Dos 20 isolados ECoP, 6 foram positivos para se (30 %) e destes, 50 % dos isolados positivos eram *Staphylococcus* spp. (3/6), 33,33 % *S. pseudointermedius* (2/6) e 16,67 % *S. schleiferi* (1/6). Interessante a observação que nenhum dos isolados *S. aureus* obtidos das morcilhas tiveram a presença de genes enterotoxigênicos.

Cinco isolados apresentaram mais de um gene se: três isolados do grupo ECoN: *S. saprophyticus* (SED e SEE), *S. cohnii* (SEA e SEB) e

Staphylococcus spp. (SEA, SEB, SED e SEE) e dois isolados do grupo ECoP:

Staphylococcus spp. (SEC e SEE; SEB e SEE).

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de morcilhas artesanais

As espécies observadas no presente estudo são habitantes naturais da pele e mucosa de animais (Nagase et al., 2002; Gillespie et al., 2009). As espécies sal manitol positivos identificadas nas morcilhas artesanais estão de acordo com outros estudos com salsichas fermentadas (Coton et al., 2010; Leroy et al., 2010). As espécies mais frequentes foram *S. saprophyticus* (37,8 %), *S. carnosus* (15,85 %) e *S. vitulinus* (8,53 %) seguidas de *S. cohnii* (6,1 %) *S. pseudointermedius* (6,09%); *S. aureus* (3,65 %); *S. schleiferi* (1,21 %) e *S. intermedius* (1,21 %) e *S. equorum* (1,2 %). Dez isolados ECoP (12,19 %) e cinco isolados ECoN (6,1 %) não puderam ser identificados como espécie e foram identificados com *Staphylococcus* spp..

A espécie *S. saprophyticus* encontrada em elevada frequência entre os isolados de morcilhas é considerada um contaminante comum de várias amostras de alimentos, em especial salsichas fermentadas e carnes cruas, sendo que foi isolada em 7 % de amostras de *swabs* retais de carcaças de bovinos e suínos (Samelis et al., 1998; Blaiotta et al., 2004a; Fontana et al., 2005; Raz et al., 2005). Em humanos o principal reservatório de *S. saprophyticus* é o TGI (Huebner & Goldmann, 1999), podendo a falta de

higiene durante manipulação das morcilhas ter colaborado para o aumento na prevalência desta espécie. A espécie *S. carnosus* também foi observada em elevada frequência no presente estudo (15,85 %), embora Leroy et al. (2010) tenha observado um baixo número de *S. carnosus* (2,5 %) no seu estudo, a presença desta espécie nas amostras de morcilhas se justifica devido ao fato de que ela é frequentemente descrita em produtos cárneos e é uma cultura *starter* comumente comercializada para a produção de salsichas (Hammes & Hertel, 1998; Corbière Morot-Bizot et al., 2007).

S. vitulinus é frequentemente relatado em queijos (Irlinger, 2008) e raramente encontrado em salsichas (Blaiotta et al., 2004a; Corbière Morot-Bizot et al., 2006). A presença desta espécie nas morcilhas (8,53 %) denota ausência de práticas higiênicas na produção e/ou na manipulação. A prevalência encontrada de *S. cohnii* (6,1 %) não está de acordo com a literatura, Leroy et al., (2010) analisaram 388 amostras de produtos cárneos e não encontraram a presença desta espécie, bem como Corbière Morot-Bizot et al., (2006) que analisaram a microbiota de estafilococos de uma pequena unidade produtora de salsichas fermentadas e também não encontraram a presença da espécie. Segundo Kloos & Wolfshohl (1983) esta espécie faz parte da microbiota da pele de humanos, o que sugere esta contaminação ter sido originada de seus manipuladores.

No presente estudo detectou-se uma baixa frequência de *S. aureus*, acordando com Oteiza et al. (2003) que não encontrou a espécie em 30 amostras de morcilhas em Buenos Aires, Argentina. Por outro lado, Adesiyun e Balbirsingh (1996) analisaram 80 amostras de morcilhas preta e isolaram 100%

de *S. aureus*. Adesiyun e Benjamin (1996) conduziram um estudo para a identificação de perigos microbianos na linha de produção de morcilhas preta de um abatedouro local e também encontraram uma alta frequência de *S. aureus* (96,8 %) ao longo da linha: ingredientes, tábua de corte, manipuladores e água como fonte de contaminação cruzada para utensílios e ingredientes.

Uma das explicações para a baixa prevalência de *S. aureus* encontrada neste estudo em relação aos outros, pode ser devido a uma classificação equivocada de espécies quando a identificação baseia-se apenas em ágar Sal Manitol (Koch, 1942; Chapman, 1945) uma vez que, isolados sal manitol positivo em amostras clínicas são sugestivos de *S. aureus*, mas como vimos, devem ser confirmados com demais testes.

5.2 – Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados

Todos os isolados testados foram suscetíveis à vancomicina, acordando com resultados observados na literatura para estafilococos isolados de alimentos (Perreten et al., 1998; Resch et al., 2008; Pesavento et al., 2007). O perfil de resistência aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina e gentamicina para estafilococos observados no presente estudo, já foi observado por outros estudos analisando alimentos similares (Perreten et al., 1998; Pesavento et al., 2007; Resch et al., 2008; Pereira et al., 2009; Even et al., 2010). Uma explicação para este fenótipo de resistência em estafilococos isolados de morcilhas poderia o fato destes antimicrobianos serem utilizados na clínica médica veterinária e como promotores de crescimento em rações animais (Phillips et al., 2004). A resistência bacteriana à eritromicina é muito

importante, porque essa droga é uma das escolhas para o tratamento de várias infecções e também de infecção em pacientes alérgicos à penicilina.

A espécie *S. saprophyticus* apresentou resistência aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina e foi o fenótipo observado em frequência elevada. Esta espécie é um componente da microbiota normal de humanos e outros primatas (Banermann & Peacock, 2007) e também pode ser encontrada em hospitais, por isso, talvez constituam reservatórios de genes de resistência (Szewczyk & Rozalski, 2000). Nam et al. (2010) analisaram isolados ECoN de mastite bovina na Coreia e detectaram isolados de *S. saprophyticus* resistentes a eritromicina e tetraciclina.

No presente estudo treze isolados mostraram um perfil de multirresistência. *Staphylococcus* spp. com este fenótipo já foram isolados de alimentos como carnes cruas, produtos cárneos fermentados, presuntos curados, salsichas, peixes fermentados, frangos, leites, queijos, pães, produtos de confeitaria e pizzas (Perreten et al., 1998; Freitas et al., 2004; Normanno et al., 2007; Resch et al., 2008; Pereira et al., 2009).

Diferente do que acontece nos casos de infecção alimentar, os antimicrobianos não têm nenhum valor no tratamento de um paciente que sofre de intoxicação alimentar. Entretanto, sua importância reside no fato de que o alimento pode ser um importante veículo de microrganismos resistentes aos antimicrobianos para humanos. A resistência bacteriana em alimentos pode promover uma rota de transferência de genes às bactérias da microbiota indígena ou potencialmente patogênicas ou através da recolonização da microbiota intestinal humana (Khan et al., 2000).

A resistência aos macrolídeos ocorre geralmente devido a metilação do 23S rRNA codificado pelo gene *erm* (eritromicina ribossomo metilação). Este gene que confere resistência cruzada com macrolídeos, lincosamida, e estreptograminas B (MLSB) está presente em plasmídeos conjugativos. Os genes de resistência à tetraciclina: *tet(K)* e *tet(L)* (mecanismos de efluxo), *tet(M)*, *tet(O)* ou *tet(R)* (proteção ribossomal) são frequentemente encontrados na mesma unidade móvel dos genes de resistência aos macrolídeos (Roberts et al., 1999). No que diz respeito à dupla resistência tetraciclina/eritromicina, o gene *erm(B)* está frequentemente relacionado com o gene *tet(M)* no transposon Tn1545, que predomina nas bactérias Gram-positivas de importância (Clewell et al., 1995; Dutka-Malen et al., 1995), o que poderia explicar a alta prevalência de resistências a ambas as drogas.

Em um estudo realizado por Perreten et al., (1998) onde foram analisados leites, carnes e seus derivados, foram isolados *S. aureus*, *S. lentus*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* resistentes à gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina. Neste estudo, o gene da enzima cloranfenicol-acetiltransferase (*cat*) que diminui a afinidade da droga ao seu sítio ativo, estava localizado em plasmídeos de 3,8 a 4,3 kb nas cepas de *S. xylosus* e *S. caprae*. Cepas de *Staphylococcus* spp. codificaram informações de um sistema de efluxo de eritromicina (*msr*) em um plasmídeo de 18 kb e cepas de *S. xylosus* resistentes à tetraciclina continham o gene *tet(K)* (efluxo tetraciclina) em um plasmídeo de 4.4 kb. Cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. typhimurium* foram isoladas de hospitais na Bélgica com resistência a apramicina/gentamicina e verificou-se que plasmídeos contendo a

enzima acetiltransferase-aminoglicosídeo [AAC(3)IV] (enzima que confere resistência a ambas as drogas) em algumas cepas humanas e animais tiveram um alto grau de identidade genética (Chaslus-Dancla et al., 1989). Outro experimento mostrou que o plasmídeo AAC(3)IV pode ser transferido de *E. coli* para *S. typhimurium* em bezerros tratados com apramicina (Hunter et al., 1992). Descheemaeker et al., (1999) na Bélgica, também estabeleceram alguma identidade de genes de resistência contra glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* isolados em porcos e aves e no homem, indicando possibilidade de troca de marcadores genéticos de resistência entre animais e o homem.

5.3 – Frequência do gene coagulase (coa) e atividade da coagulase

Quando associada a presença do gene *coa* com a atividade da coagulase, encontrou-se 55,0 % dos isolados com genótipo e fenótipo positivos para *coa*, entretanto 8,06 % dos isolados com genótipo positivo não apresentaram atividade de coagulase. Em um estudo feito por Vieira-da-Motta et al., (2001) com 15 isolados de *S. aureus* de leites de vacas com mastite subclínica, foram encontrados 4 cepas (26,67 %) com fenótipo negativo na prova da coagulase em tubo e genótipo positivo para o gene *coa*, sugerindo a não expressão enzimática *in vitro*. Cremonesi et al., (2005) também sugeriram que a presença do gene da coagulase não é necessariamente associada à expressão fenotípica. Fatores ligados à disponibilidade de nutrientes, condições ambientais ou fisiológicas intrínsecas da bactéria podem estar associados a não expressão do gene (Bergdoll, 1989). A expressão do gene

coa ocorre geralmente durante a fase de crescimento exponencial (Engels et al., 1978) e pode ser reprimido por um elemento de regulação denominado gene regulador acessório (*agr*) (Peng et al., 1988). Outro locus de regulação denominado regulador acessório staphylococcus (*sar*), também afeta a expressão da exoproteína em *S. aureus*, e cepas mutantes produzem baixas quantidades de coagulase (Cheung et al., 1992). A mutação em um desses loci poderia, teoricamente, dar um fenótipo coagulase-negativo, uma vez que pouca quantidade da proteína não causaria a coagulação do plasma.

Foi detectado que 45,0 % (9/20) dos isolados com fenótipo ECoP que não apresentaram o gene *coa*, uma explicação para este comportamento pode ser devido a produção de pseudocoagulases, que já foram descritas para ECoN (Wegrzynowicz et al., 1979; Bulanda et al., 1988) e podem ter contribuído para resultados falso-positivos. Outra possível explicação para esse fenômeno poderia ser uma mutação na região primer de ligação do gene *coa*.

5.4 – Polimorfismo do gene *coa*

Estudos têm demonstrado que o gene *coa* contém vários números de sequências repetidas degeneradas, o que lhe dá uma característica polimórfica em número e sequência (Phonimdaeng et al., 1990; Goh et al., 1992; van Belkum et al., 1997).

Dezesseis isolados apresentaram o gene da coagulase com variações no tamanho dos fragmentos. Esta variação também foi observada por outros autores em estafilococos. Goh et al., (1992) observaram fragmentos de 440 a 915 bp, Moon et al., (2007) de 620 a 809 bp, Hookey et al., (1998) de 547 a 875 pb e Scherrer et al., (2004) de 500 a 820 pb.

A análise do polimorfismo do gene *coa* tem sido relatada em *S. aureus* em estudos epidemiológicos através de um padrão de restrição enzimática (Goh et al., 1992; Hookey et al., 1998; da Silva et al., 2005; Aslantas et al., 2007; Himabindu et al., 2009). Os resultados aqui observados com a clivagem pela enzima *AluI* indicam uma heterogeneidade considerável no gene *coa* das cepas isoladas de morcilhas e o padrão de restrição do gene da coagulase não pode ser usado para a identificação de isolados nem para agrupá-los. Uma explicação poderia ser o fato de que os isolados analisados por PCR-RFLP eram compostos por outros estafilococos sal manitol positivos, não somente a espécie *S. aureus*. Outra explicação encontrada para estes resultados é a falta de informações sobre a fabricação das morcilhas analisadas, uma vez que o estudo objetivou analisar produtos prontos para o consumo e não as práticas de fabricação, ou seja, a fonte manipuladora não foi investigada.

Outros autores têm demonstrado que o padrão de restrição do gene *coa* em *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é de grande importância na epidemiologia dos surtos nosocomiais (Goh et al., 1992; Hookey et al., 1998). Por outro lado, Aslantas et al. (2007) observaram uma maior variabilidade de PCR-RFLP do gene *coa* de *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina na Turquia. Esta variação é relevante para o *pool* de bactérias, sua diversidade e as condições ambientais de cada região geográfica.

5.5 – Prevalência e distribuição dos genes de enterotoxinas (se)

É amplamente aceito que a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) é uma característica do grupo ECoP e muitos trabalhos

são realizados avaliando a espécie *S. aureus* em alimentos ou matérias-primas (Johnson et al., 1991; Scherrer et al., 2004; Cremonesi et al., 2005; Pinto et al., 2005; Silva et al., 2005; Pepe et al., 2006; Hwang et al., 2007; Moon et al., 2007; Nema et al., 2007; Zocche et al., 2010; Ertas et al., 2010). Entretanto, no presente estudo nenhum isolado *S. aureus* apresentou genes de enterotoxinas, indo de encontro aos resultados apresentados em trabalhos anteriores (Johnson et al., 1991; Scherrer et al., 2004; Cremonesi et al., 2005; Pinto et al., 2005; Silva et al., 2005; Pepe et al., 2006; Hwang et al., 2007; Moon et al., 2007; Nema et al., 2007; Zocche et al., 2010; Ertas et al., 2010). Veras et al., (2003) analisaram 22 isolados de ECoP obtidos a partir de laticínios envolvidos em surtos de intoxicação alimentar e detectaram a produção de SE em 63,63 % (14/22) e também encontraram uma alta prevalência das SEA e SEB. No presente estudo a prevalência entre os ECoP foi de 18,18 % (6/33) e os genes *see*, *sea* e *seb* foram os mais prevalentes.

Neste estudo foi detectado a presença de genes *se* nas espécies ECoP *S. schleiferi* e *S. pseudointermedius*. A espécie *S. schleiferi* já foi descrita como enterotoxigênica (Lamaita et al., 2005) em leites crus refrigerado, porém sobre a espécie *S. pseudointermedius* não tem-se relatos de sua enterotoxigenicidade em alimentos, apenas em amostras clínicas isoladas de cães (Yoon et al., 2010), uma vez que esta espécie faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de cães e gatos (Cox et al., 1985; Cox et al., 1988; Talan et al., 1989).

Poucos estudos têm buscado identificar a presença das enterotoxinas em espécies ECoN em alimentos (Valle et al., 1990; Cunha et al.,

2006; Veras et al., 2003; Zell et al., 2008) e em manipuladores (Udo et al., 1999). A divergência existente acerca da enterotoxigenicidade dos ECoN e sua capacidade de causar intoxicação alimentar e/ou outras doenças associadas apontam para a necessidade de mais estudos utilizando técnicas de confiança que possam confirmar a capacidade da produção de toxinas por estafilococos. Alguns estudos têm demonstrado que algumas espécies ECoN possuem os genes para SE e podem produzir a toxina funcional (Omori & Kato, 1959; Lachica et al., 1969; Breckinridge & Bergdoll, 1971; Lotter & Genigeorgis, 1975; Danielsson & Heliberg, 1977; Hoover et al., 1983; Becker et al., 2001a; Blaiotta et al., 2004a).

Neste estudo a prevalência de ECoN positivos para genes de enterotoxinas entre os isolados de morcilhas foi de 81,81 % (27/33). Entre os genes, o mais prevalente foi sea com 83,33 % (10/12), seb com 81,81 % (9/11) seguido de sec com 87,5 % (7/8). As prevalências encontradas para este grupo estão de acordo com outros trabalhos. Cunha et al. (2006) ao investigar a presença de genes enterotoxigênicos em ECoN isolados de alimentos encontraram 10 % de amostras positivas, das quais 75 % foram para o gene sea e 25 % para o gene sec. Valle et al. (1990) investigaram a presença de estafilococos enterotoxigênicos em amostras de pele, mucosa nasal e leite de 133 cabras sadias e detectaram 22 % de ECoN produtores de enterotoxinas, obtendo a seguinte prevalência SEC (67.9 %), SEE (9.9 %), SEA (7.1 %) e SEB (3.6 %). Veras et al. (2003) também analisaram 7 isolados ECoN (*S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. cohnii*) e detectaram a produção de SE em 71,43 % (5/7) encontrando a presença SEA e SEC. Zell et al., (2008)

analisaram o potencial enterotoxigênico de culturas *starter* e encontraram 22,22 % de *S. carnosus* (2/9) positivo para os genes *sea* e *see* e 50,0 % de *S. equorum* (5/10) positivo para *sed*. Uma das principais vantagens das culturas *starter* no processamento de alimentos é que a fermentação e o processo de maturação podem ser realizados em condições controladas. Estes estudos mostraram que as linhagens utilizadas na produção de alimentos, encontradas em grande quantidade em fermentados, não devem ser consideradas seguras, devendo ser analisadas em relação ao seu potencial toxigênico para evitar efeitos negativos sobre a saúde dos consumidores. Ao investigar manipuladores de alimentos em restaurantes, Udo et al. (1999) também encontraram 14,1 % das amostras de ECoN produtoras de enterotoxinas e, entre as espécies, *S. saprophyticus* e *S. schleiferi* foram positivas para SEA e SEB, levantando a importante questão da contaminação cruzada.

A enterotoxigenicidade dos ECoN tem sido descrita por vários autores e questionada por outros (Becker et al., 2001b), mas poucos estudos têm sido realizados para determinar a capacidade enterotoxigênica dos ECoN em alimentos. Apesar deste grupo ser muitas vezes considerado apenas contaminante em alimentos, deve ser dada a estes microrganismos uma importância maior, porque além de serem importantes patógenos nosocomiais, apresentam também um potencial toxigênico.

Os dados aqui apresentados para estafilococos enterotoxigênicos acordam com observações anteriores de que SEA, SEB e SEC são os mais prevalentes entre as toxinas identificadas. SED e SEE são produzidos com menor frequência em isolados de surtos (Iandolo, 1989; Omoe et al., 2002). As

SEs mais frequentemente implicadas em surtos são SEA e SEB (Jett et al., 2001). Estas toxinas são conhecidas por ocuparem o mesmo locus cromossômico, o que pode justificar o porquê destas enterotoxinas serem geralmente encontradas juntas em surtos de intoxicação alimentar (Shafer et al., 1978a; Shafer et al., 1978b).

6 – CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a microbiota predominante de estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas artesanais consiste de espécies do grupo ECoN, das quais *S. saprophyticus* e *S. carnosus* foram as mais prevalentes.

Todos os isolados estudados foram sensíveis à vancomicina. O perfil de resistência foi mais frequente para as drogas eritromicina e tetraciclina, bem como a espécie *S. saprophyticus*.

Ao relacionar presença do gene *coa* com atividade de sua enzima encontrou-se isolados com genótipo positivo sem atividade enzimática, sugerindo que a presença do gene da coagulase não é necessariamente associada à sua expressão.

Foi possível constatar a presença do polimorfismo entre os isolados que apresentaram o gene da coagulase e o padrão de restrição do gene com a enzima *AluI* não pode ser usado para a identificação de isolados ou um agrupamento de isolados por fonte de amostra.

A técnica de PCR detectou a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nos isolados e uma porcentagem dos isolados demonstrou ser potencialmente patogênica devido à presença destes genes. Uma elevada

prevalência de SE foram identificadas em amostras pertencentes ao grupo ECoN.

A técnica de multiplex mostrou ser uma ferramenta adequada para identificar a presença dos genes *se*, pois permitiu amplificar um total de 3 genes em uma só reação.

7 - PERSPECTIVAS

Avaliar o perfil de restrição enzimática do gene *coa* com outras enzimas de restrição para verificar se é possível encontrar um padrão homogêneo entre as espécies.

Avaliar a expressão dos genes de enterotoxinas através da técnica de PCR quantitativo e assim, avaliar se os isolados enterotoxigênicos do grupo ECoN podem ser considerados patógenos alimentares.

Levar as informações obtidas neste estudo às autoridades sanitárias para que sejam reavaliados os padrões de legislação para alimentos vigente no Brasil que, por sua vez, considera potencialmente patogênico apenas o grupo dos estafilococos coagulase positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M., DANGLER, C.A., SORDILLO, L.M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Can J Vet Res**, Canada, v.59, p.124–128, 1995.
- ADESIYUN, A.A. & BALBIRSINGH, V. Microbiological analysis of 'black pudding', a Trinidadian delicacy and health risk to consumers. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.31,p. 283-299, 1996.
- ADESIYUN, A.A. & BENJAMIN, L.A. Identification of microbial hazards, methods for their control and critical control points for black pudding ('boudin noir'). **Food Microbiol**, Netherlands, v.13, p.243-256, 1996.
- 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.
- ASLANTAS, Ö., DEMIR, C., TÜRÜTOĞLU, H., CANTEKIN, Z., ERGÜN, Y. & DOGRUER, G. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Turk J Vet Anim Sci**, Turkey, v.31, p.253-257, 2007.
- ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Pork and Uncooked Smoked Ham - a Comparison of Classical Culturing Detection and RFLP-PCR. **Int. J. Food Microbiol**, Netherlands, v.68, p.105–113, 2001.
- BALABAN, N. & RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (review). **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.61, p.1-10, 2000.
- BANNERMAN, T.M.; PEACOCK, S.J. **Staphylococcus, Micrococcus and Other Catalase-Positive Cocci**. In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, 9 Edition. Washington, DC: ASM Press, v. 1, p.390-411, 2007.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, United States, v.45, p.493-496, 1966.
- BAYLES, K.W & IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxina D. **J. Bacteriol**, United States, v.171, p.4799-4806, 1989.
- BECKER K, KELLER B, VON EIFF C, BRUCK M, LUBRITZ G, ETIENNE J, et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.67, p.5551-7, 2001a.

BECKER, K.; HAVERKAMPER, G.; VON EIFF, C.; ROTH, R.; PETERS, G. Survey of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-Staphylococcus aureus species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Germany, v.20, p.407-409, 2001b.

BERGDOLL, M.S. **Staphylococcus aureus. Foodborne Bacterial Pathogens.** In Doyle, M. P. (Ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., 1989, p.463-523.

BERGDOLL, M.S. Identification of enterotoxin E. **Infect Immun**, United States, v.4, p.5593-5, 1971.

BERGDOLL, M.S., CRASS, B.A., REISER, R.F., ROBBINS, R.N. & DAVIS, J.P. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome Staphylococcus aureus isolates. **Lancet**, United States, v.1, p.1017-21, 1981.

BERGDOLL, B. Analytical methods for Staphylococcus aureus. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.10, p.91-100, 1990.

BETLEY, M.J. & MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **J Bacteriol**, United States, v.179, p.34-41, 1988.

BETLEY, M.J. et al. Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. **Proc Natl Acad Sci USA**, United States, v.81, p.5179-5183, 1984.

BETLEY, M.J. et al. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chem Immunol**, Switzerland, v.55, p.1-35, 1992.

BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENNACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O., et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus spp strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in S. aureus AB- 8802. **J Appl Microbiol**, England, v.97, p.719-730, 2004b.

BLAIOTTA, G., PENNACCHIA, C., VILLANI, F., RICCIARDI, A., TOFALO, R. & PARENTE, E. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. **J Appl Microbiol**, England, v.97, p.271-284, 2004a.

BOHACH, G.A. & SCHLIEVERT, P.M. Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 e C2. **Infect Immun**, United States, v.57, n.7, p.2249-2252, 1989.

BOHACH, G.A. & SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Mol Genet Genomics**, Germany, v.209, p.15-20, 1987.

BRASIL. **Ministério da Saúde** (2009). Disponível on-line em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf acesso em 08 de Novembro de 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n. 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível on-line em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm > acesso em 20 de agosto de 2008.

BRECKINRIDGE, J.C., & BERGDOLL, M.S. Outbreak of food borne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin producing Staphylococcus. **N Engl J Med**, United States, v.284, p.541-543, 1971.

BULANDA, M., Z. WEGRZYNOWIZ, M. CIURAK, J. KAVALCZYK, G. KUPRYSZEWSKI, M. GRUSZKA, P. B. HECZKO, AND G. PULVERER. A new chromogenic assay for direct detection of staphylocoagulase. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, Germany, v.270, p.115-121, 1988.

CARMO, L.S & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Rev Microbiol**, Brasil, v.21, n.4, p.320-323, 1990.

CASMAN, E.P. Staphylococcal Enterotoxin. **Ann N Y Acad Sci**, United States, v.128, p.124–131, 1965.

CASMAN, E.P.; BENNET, E.P.; DORSEY, A.E. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J Bacteriol**, United States, v.94, n.6, p.1875-1882, 1967.

CHAPMAN, G.H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. **J Bacteriol**, United States, v.50, p.201-203, 1945.

CHASLUS-DANCLA, E., GLUPCZYNSKI, Y., GERBAUD, G.L., LAGORCE, M., LAFONT, J.P. & COURVALIN, P. Detection of apramycin resistant Enterobacteriaceae in hospital isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, England, v.61, p.261–266, 1989.

CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 e C3 enterotoxin type of Staphylococcus aureus strain isolates from food-borne outbreaks. **Int J Food Microbiol**, Netherlands v.71, p.63-70, 2001.

CHEUNG, A.L., KOOMEY, J.M., BUTLER, C.A., PROJAN, S.J. & FISCHETTI, V.A. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. **Proc Natl Acad Sci USA**, United States, v.89, p.6462-6466, 1992.

CHOI, Y.W.; KOTZIN, B.; HERRON, L.; CALLAHAN, J.; MARRACK, P.; KAPPLER, J. Interaction of *Staphylococcus aureus* Toxin "Superantigens" with Human T Cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, United States, v.86, p.8941-8945, 1989.

CLEWELL, D.B., FLANNAGAN, S.E. & JAWORSKI, D.D. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. **Trends Microbiol**, v.3, p.229-236, 1995.

CLSI. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. Tables M100- S18 2008 and MS 100-15. 25, 1, 2008.

CORBIÈRE MOROT-BIZOT, S., LEROY, S. & TALON, R. Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. **J Appl Microbiol**, England, v.102, p.238-244, 2007.

CORBIÈRE MOROT-BIZOT, S., LEROY, S. & TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.108, p.210-217, 2006.

CORDEIRO, D. N. G. **Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília – DF**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina - núcleo de medicina tropical, UNB, Brasília, 2007.

COTON, E., DESMONTS, M.H., LEROY, S., COTON, M., JAMET, E., CHRISTIEANS, S., DONNIO, P.Y., LEBERT, I. & TALON, R. Biodiversity of Coagulase-Negative *Staphylococci* in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.137, p.221-229, 2010.

COUCH, J.L. & BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **J Bacteriol**, United States, v.171, p.4507-4510, 1989.

COUCH, J.L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M.J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **J Bacteriol**, United States, v.170, p.2954-2960, 1988.

COX, H.U., HOSKINS, J.D., NEWMAN, S.S., FOIL, C.S., TURNWALD, G.H., ROY, A.F. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. **Am J Vet Res**, United States, v.49, p.747–751, 1988.

COX, H.U., HOSKINS, J.D., NEWMAN, S.S., TURNWALD, G.H., FOIL, C.S., ROY, A.F. KEARNEY, M.T., Distribution of staphylococcal species on clinically healthy cats. **Am J Vet Res**, United States, v.46, p.1824–1828, 1985.

CREMONESI, P., LUZZANA, M., BRASCA, M., MORANDI, S., LODI, R., VIMERCATI, C., AGNELLINI, D., CARAMENTI, G., MORONI, P. & CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol Cell Probes**, England, v.19, p.299-305, 2005.

CUNHA NETO, A. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1999. 65 f. Dissertação (Mestrado) – UFEPE, Recife, 1999.

CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O. AND ARAÚJO JR, J.P. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Braz J Microbiol**, Brasil, v.37p,70–4, 2006.

da SILVA, E. R., BOECHAT, J.U.D. & da SILVA, N. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. **Lett Appl Microbiol**, England, v.42, p.30-34, 2006.

DANIELSSON, M.L., & HELIBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. **Acta Vet Scand**, England, v.18, p.266-273, 1977.

DESCHEEMAEKER, P.R.M., CHAPELLE, S., DEVRIESE, L.A., BUTAYE, P., VANDAMME, P., GOOSSENS, H. Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide resistance genes of human and animal origins. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.43, p.2032-2037, 1999.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxin of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DORIGON, C. & RENK, A. **Técnicas e métodos tradicionais de processamento de produtos coloniais: de “miudezas de colonos pobres” aos mercados de qualidade diferenciada**. Disponível on-line em: <http://www.alasru.org/cd alasru2010/1%20trabalhos%20completos/GT-4/GT4%20Clovis%20Dorigon.pdf> acesso em 12 de Novembro de 2010.

DOYLE, M. P., BUSTA, F., CORDS, B. R. & DAVIDSON, P. M. Antimicrobial Resistance: Implications for the food system. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, United States, v.5, p.71-137, 2006.

DUTKA-MALEN, S., EVERS, S. & COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **J Clin Microbiol**, United states, v.33, p.24–27, 1995.

ENGELS, W., KAMPS, M. & Van BOVEN, C.P.A. Influence of cultivation conditions on the production of staphylocoagulase by *Staphylococcus aureus*. **J Gen Microbiol**, England, v.109, p.237-243, 1978.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z., YILDIRIM, Y., KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.142, p.74–77, 2010.

EVEN, S., LEROY, S., CHARLIER, C., ZAKOUR, N. B., CHACORNAC, J. P., LEBERT, I., JAMET, E., DESMONTS, M. H., COTON, E., POCHET, S., DONNIO, P. Y., GAUTIER, M., TALON, R. & Le LOIR Y. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.139, p.87-95, 2010.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of Human Dose of Staphylococcal Enterotoxin A From a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. **Int. J. Food Microbiol.**, Netherlands, v.7, p.311–316, 1998.

FDA (1998). **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível on-line em <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> acesso em 30 de Novembro de 2008.

FITZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R., FOSTER, T.J., BOHACH, G.A., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., & SMYTH, C.J. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine *Staphylococcus aureus* Encoding Multiple Superantigens. **J Bacteriol**, United States, v.183, n.1, 2001.

FLEISCHER, B. ET AL. An evolutionary conserved mechanism of T-cell activation by microbial toxins. Evidence for different affinities of T-cell receptortoxin interaction. **J Immunol**, Unbited States, v.146, p.11-17, 1991.

FONTANA, C., VIGNOLO, G. & COCCONCELLI, P. S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. **J Microbiol Methods**, Netherlands, v.63, p.254-263, 2005.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2005, 196p. ISBN: 8573791217

FREITAS, M. F. L., MOTA, R. A., LEÃO, A. E. D. S., FIGUEIREDO, M. L., FONTE, M. M. & VIEIRA R. F. C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de

Staphylococcus spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Brasil, v.56, n.3, p.405-407, 2004.

GELLI, D.S.; JACABI, M.; SAKUMA, H.; RAMALHO, A.M.; RISTORI, C.A. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de saúde pública do Estado de São Paulo, no período de 1994 a 1998. **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Salvador (BA), 1999.

GILLESPIE, B.E., HEADRICK, S.I., BOONYAYATRA, S. & OLIVER, S.P. Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.134, p.65-72, 2009.

GOH, S.H., BYRNE, S.K, ZHANG, J.L. & CHOW, A.W. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphism. **J Clin Microbiol**, United States, v.30, p.1642-1645, 1992.

GONTANG, E.A., FENICAL, W. & JENSEN P.R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.73, p.3272-3282, 2007.

HAMMES, W.P. & HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Sci**, England, v.49, p.125-138, 1998.

HENDERSON, A., & BRODIE, J. Investigations on staphylococcal coagulase. **Br J Exp Pathol**, England, v.44, p.524-528, 1963.

HIMABINDU, M., SUGAPRIYA MUTHAMILSELVAN, D., BISHI, D. K. & VERMA, R.S. Molecular Analysis of Coagulase Gene Polymorphism in Clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus by Restriction Fragment Length Polymorphism Based Genotyping. **Am J Infect Dis**, United States, v.5, p.170-176, 2009.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in food. **Ann Agric Environ Med**, Poland, v.9, p.179-182, 2002.

HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787p.

HOOKEY, J.V., RICHARDSON, J.K. & COOKSON, B.D. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J Clin Microbiol**, United States, v.36, p.1083-1086, 1998.

HOOVER, D.G., TATINI, S.R., MALTAIS, J.B. Characterization of staphylococci. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.46, p.649-660, 1983.

HUEBNER, J. & GOLDMANN, D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annual Rev Med**, United States, v.50, p.223-236, 1999.

HUI, Y.H., GORHAM, J.R., MURREL, K.D. **Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker, v.1, 1994.

HUNTER, J.E., SHELLEY, J.C., HART, C.A. AND BENNETT, M. Apramycin resistance plasmids in *Escherichia coli*: possible transfer to *Salmonella typhimurium* in calves. **Epidemiol Infect**, England, v.108, p.271–278, 1992.

HUYS, G., D'HAENE, K., VAN ELDERE, J., VON HOLY, A. & SWINGS, J. Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a poultry processing plant. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.71, p.574-579, 2005.

HWANG, S.Y., KIM, S.H., JANG, E.J., KWON, N.H., PARK Y.K., KOO, H.C., JUNG, W.K., KIM, J.M., PARK, Y.H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.117 n.2007, p.99–105, 2007

IANOLO, J.J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Microbiol**, v.43, p.375-402, 1989.

IANOLO, J.J. **The genetics of staphylococcal toxins and virulence factors**. In **Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis**. New York: Academic Press, Edited by B. H. Iglewski & V. L. Clark, 1990, p.399-426.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.126, p.302-310, 2008.

JARRAUD, S. A highly prevalent operon of enterotoxin gene forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Immunol**, Netherland, v.166, p.669–77, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**, 6.ed. – Porto Alegre : Artmed, capítulo 5, págs 105 – 117, 2005.

JELJASZEWICZ, J., SWITALSKI, L. M. & ADLAM, C. **Staphylocoagulase and clumping factor**, In C. S. F. Easmon and C. Adlam (ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academic Press, vol. 2. p. 525-557, 1983.

JETT M., IONIN B., DAS, R., NEILL, R. **The staphylococcal enterotoxins**. In: Sussman M, editor. *Molecular medical microbiology*. San Diego: Academic Press, p. 1089—116, 2001.

JOHNS, JR.M.B & KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene associated with discrete genetic element. **J Bacteriol**, United States, v.170, p.4033-4039, 1988.

JOHNSON, W.U., TYLER, S.D., EWAN, S.P., ASHTON, F.E., POLLAND, D.E., ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, United States, v.29, p.426–430, 1991.

KAIDA, S., MIYATA, T., YOSHIZAWA, Y., IGARASHI, H. & IWANAGA, S. Nucleotide and deduced amino acid sequence of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. **Nucleic Acids Res**, England, v.17, n.1, p.8871,1989.

KAIDA, S., MIYATA, T., YOSHIZAWA, Y., KAWABATA, S., MORITA, T., IGARASHI H. & IWANAGA S. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. **J Biochem**, England, v.102, p.1177-1186, 1987.

KHAN, S.A., NAWAZ, M.S., KHAN, A.A. & CERNIGLIA, C.E. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, United States, v.38, p.1832-1838, 2000.

KLOOS, W.E. & WOLFSHOHL, J.F. Deoxyribonucleotide sequence divergence between *Staphylococcus cohnii* subspecies populations living on primate skin. **Curr Microbiol**, United States, v.8, p.115-121, 1983.

KOCH, F.E. Electivnährboden für Staphylokokken. **Zentr Bakt Parasitenk I Orig**, Germany, v.149, p.122-124, 1942.

KOKAN, N.P. & BERGDOL, M.S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.53, n.11, p.2675-2676, 1987.

KONEMAN, F.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, P.C. et al. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5ª edição. São Paulo: MEDSI, 2001, p.551-588.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T., BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.97, p.137-145. 2004.

LACHICA, V.R.F., WEISS, K.F. & DEIBEL, R.H. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. **Appl Microbiol**, United States, v.18, p.126-127, 1969.

LADHANI, S.; JOANNOU. C.L.; LOCHRIE, D.P. et al. Clinical, microbial and biochemical aspects of exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.12, n.2, p.224-242, 1999.

LAMAITA, H.C., CERQUEIRA, M.M.O.P., CARMO, L.S., SANTOS, D.A., PENNA, F.A.M., SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Brasil, v.57, n.5, p.702-709, 2005

LANGE, C., CARDOSO, M., SENCZEK, D. & SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.67, p.127-141, 1999.

LEROY, S., GIAMMARINARO, P., CHACORNAC, J. P., LEBERT, I. & TALON, R. Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. **Food Microbiol**, Netherland, v.27, p.294-301, 2010.

LETERTRE, C., PERELLE, S., DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxina SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **J Appl Microbiol**, Oxford England, v.2, p.63-76, 2003.

LIEPE, H.U. - Starter cultures in meat production. **Biotechnol**, United States, v.5, p.399-424, 1983.

LINDSAY, J.A.; RUZIN, A.; ROSS, H.F.; KUREPINA, N.; NOVICK, R.P. The Gene for Toxic Shock Toxin Is Carried by a Family of Mobile Pathogenicity Islands in *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**, England, v.29, p.527-543, 1998.

LBSN (2011). **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível on-line em <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> acesso em 01 de Março de 2011

LOTTER, L.P. & GENIGEORGIS, C.A. Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. **Appl Microbiol**, United States, v.29, p.152-158, 1975.

LUJÁN, N. **Como Piñones Mondados: Cuento De Cuentos De Gastronomía**. Barcelona: Folio, S.A., 1994, 262p.

LYON, B.R. & SKURRAY, R. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. **Microbiol Rev**, United States, v.51, n.1, p.88-134, 1987.

MACMICKING, J.D. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, United States, v.81, p.641–50, 1995.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed., São Paulo: Prentice Hall, 2004, 608p.

MARR, J.C., LYON, J.D., ROBERSON, J.R., LUPHER, M., DAVIS, W.C. & BOHACH, G.A. Characterization of Novel Type C Staphylococcal Enterotoxins: Biological and Evolutionary Implications. **Infect Immun**, United States, v.61, p.4254–62, 1993.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, United States, v.48, p.705–11, 1990.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxins genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J Food Prot**, United States, v.63, p.479-488, 2000.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infect. Dis**, United States, v.5, p.607–625, 1999.

MEATS, P. **Modern Food Microbiology Food Science Texts Series**, DOI: 10.1007/0-387-23413-6_5 Chapter 5. Processed Meats and Seafoods. v.3, 2005, p.101-124.

MESQUITA, M. O.; DANIEL, A. P., SACCOL; A. L. F. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciênc Tecnol Aliment**, Brasil, v.26, p.198-203, 2006.

MONTESINOS, I. et al. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsedfield gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **J Clin Microbiol**, United States, v.40, n.6, p.2119-2125, 2002.

MOON, J.S., LEE, A.R., KANG, H.M., LEE, E.S., JOO, Y.S., PARK, Y.H., KIM, M.N., KOO, H.C. Antibiogram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis **J Dairy Sci**, v.90, p.1716-1724, 2007.

MORONI, P., VELLERE, F., ANTONINI, M., PISONI, G., RUFFO, G. & CARLI, S. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Int J Antimicrob Agents**, Netherlands, v.23, p.637-640, 2004.

MOSSEL, D.A.A & GARCIA, M.B. **Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar e comprobar la inocuidade y la calidade de los alimentos**, 1ª ed. Zaragoza: Acribia, 1975, 375p.

MUHAMMAD. G., HOBLET. K.H., JACKWOOD, D.J., BECH-NIELSEN, S., SMITH, K.L. Interspecific conjugal transfer of antibiotic resistance among staphylococci isolated from bovine mammary gland. **Am J Vet Res**, United States, v.54, p.1432-1440, 1993.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. et al. **Microbiologia Médica** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 604p.

NAGASE, N., SASAKI, A., YAMASHITA, K., SHIMIZU, A., WAKITA, Y., KITAI, S. & KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J Vet Med Sci**, Japan, v.64, p.245-250, 2002.

NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **J Food Prot**, United States, v. 66, p. 1055-1062, 2003.

NAM, H. M., LIM, S. K., KIM, J. M., KANG, H. M., MOON, J. S., JANG, G.C., KIM, J.M., WEE, S. H., JOO, Y. S. & JUNG, S. C. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **J Microbiol Biotechnol**, Korea (South), v.20, p.1446-1449, 2010.

NEMA, V., AGRAWAL, R., KAMBOJ, V., GOEL, A.K., SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.117, p.29-35, 2007.

NORMANNO, G., LA SALANDRAB, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., CORRENTE, M., PARISI, A., SANTAGADA, G., FIRINU, A., CRISSETTI, E. & CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.115, p.290-296, 2007.

NØRRUNG, B., ANDERSEN, J. K., BUNCIC, S. **Safety of Meat and Processed Meat. Food Microbiology and Food Safety**. 2009, Part 1, p.3-29. DOI: 10.1007/978-0-387-89026-5_1 Chapter 1. Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and Resistance Island of *Staphylococci*. **Microbes Infect**, France, v.3, p.585-594, 2001.

OLIVEIRA, A.M.; GONÇALVES, M.O.; SHINOHARA, N.K.S.; STAMFORD, T.L.M. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, Brasil, v.17, n.114/115, p.12-17, 2003.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiol Lett**, England, v.246, p.191-198, 2005.

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

OMORI, G. & KATO, Y. A staphylococcal food poisoning caused by coagulase negative strain. **Biken J**, Japan, v.2, p.92-96, 1959.

OSTERLUND, A., KAHLMETER, G., BIEBER, L., RUNEHAGEN, A. & BREIDER, J.M. Intrafamilial spread of highly virulent *Staphylococcus aureus* strains carrying the gene for Pantone-Valentine leukocidin. **Scand J Infect Dis**, England, v.34, p.763-4, 2002.

OTEIZA, J.M., GIANNUZZI, L. & CALIFANO, A. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. **Food Res Int**, Canada, v.36, p.703-712, 2003.

PELISSER, M.R., KLEIN, C.S, ASCOLI, K.R., ZOTTI, T.R., ARISI, A.C.M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of Classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Braz J Microbiol**, Brasil, v.40, p.145-148, 2009.

PENG, H.C., NOVICK, R.P., KREISWIRTH, B., KORNBLUM, J. & SCHLIEVERT, P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, United States, v.170, p.4365-4372, 1988.

PEPE, O., BLAIOTTA, G., BUCCI, F., ANASTASIO, M., APONTE, M. VILLANI, F. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.72, n.11, p.7075-7062, 2006.

PEREIRA, P.M.A., CASTRO, E.A.R., PEREIRA, A.A., TÓRTORA, J.C.O. Resistência a antimicrobianos em estafilococos Coagulase-negativa Isolados de Hemocultura. **J Bras Med**, Brasil, v.93, p.26-29, 2007.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiol**, Netherlands, v.26, p.278-282, 2009.

PERRETEN V., GIAMPA N., SCHULER-SCHMID U. & TEUBER M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.21, p.113-120, 1998.

PESAVENTO, G., DUCCI, B., COMODO, N. & LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, England, v.18, p.196-200, 2007.

PHILLIPS, I., CASEWELL, M., COX, T., DE GROOT, B., FRIIS, C., JONES, R., NIGHTINGALE, C., PRESTON, R., WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J Antimicrob Chemother**, England, v.53, p.28-52, 2004.

PHONIMDAENG, P., M. O'REILLY, P. NOWLAN, A. J. BRAMLEY, AND T. J. FOSTER. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase- deficient mutants. **Mol. Microbiol**, England, v.4, p.393-404, 1990.

PIETTE, A. & VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.134, p.45–54 2008.

PINTO, B., CHENOLL, E., AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.28, p.340-352, 2005.

PLACE, R.B., HIESTAND, D., GALLMANN, H.R., TEUBER, M., *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semihard cheeses. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.26, p.30-37, 2003.

POINDEXTER, N.J. & SCHLIEVERT P.M. Toxic-shock-syndrome toxin 1-induced proliferation of lymphocytes: comparison of the mitogenic response of human, murine, and rabbit lymphocytes. **J Infect. Dis**, United States, v.153, p.772-779, 1986.

PRADO, C.S.; SANTOS, W.L.M., CARVALHO, C.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Brasil, v.52, p.417- 423, 2000.

PREVOST, G., COUPPIE, P., PREVOST, P., GAYET, S., PETIAU, P., CRIBIER, B., MONTEIL, H. AND PIEMONT, Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **J Med Microbiol**, England, v.42, p.237–45, 1995.

RAPINI, L.S., TEIXEIRA, J.P., MARTINS, N.E., CERQUEIRA, M.M.O.P., SOUZA, M.R., PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas

de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Brasil, v.56 n.1, p.130-133, 2004.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos isolados de queijo tipo coalho. **Higiene Alimentar**, Brasil, v.17, p.104-105, 2003.

RAZ, R., COLODNER, R. & KUNIN, C.M. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? **Clin Infect Dis**, United States, v.40, p.896-898, 2005.

REEVES, M.W., DRUMMOND, M.C. & TAGER, M. Partial purification and characterization of the multiple molecular forms of staphylococcal clotting activity (coagulase). **J Bacteriol**, United States, v.148, p.861-868, 1981.

RESCH, M., NAGEL, V., HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.127, p.99-104, 2008.

RIGATTI, F., TIZOTTI, M.K., HÖRNER, R., DOMINGUES, V.O., MARTINI, R., MAYER, L.E., KHUN, F.T., DE FRANÇA, C.A., DA COSTA, M.M. Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasil, v.43, n.6, p.686-690, 2010.

ROBERTS, M.C., SUTCLIFFE, J., COURVALIN, P., JENSEN, L.B., ROOD, J., SEPPALA, H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 43, n.12, p.2823-30, 1999.

ROÇA, R.O. **Embutidos** - Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal Disponível em <<http://pucrs.campus2.br/~thompson/TPOA-Carne/Roca113.pdf>> Acesso em 27, Abril, 2008

ROGERS, K.L., FEY, P.D. & RUPP, M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect Dis Clin North Am**, United States, v.23, p.73-98, 2009.

ROSEC, J.P. & GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Int J Food Microbiol**, Netherland, v.77, p.61-70, 2002.

SADER H.S., JONES R.N., GALES A.C., et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**, Brasil, v.8, p.25-79, 2004.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., VLASSI, M. & PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.44, p.69-82, 1998.

SAMELIS, J., STAVROPOULOS, S., KAKOURI, A., METAXOPOULOS, J., Quantification and characterisation of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. **Food Microbiol**, Netherlands, v.11, p.447-460, 1994.

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

SCHAD, E.M., PAPAGEORGIU, A.C., SVENSSON, L.A. AND ACHARYA, K.R. A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity. **J Mol Biol**, England, v.269, p.270–80, 1997.

SCHAECHTER, M., ENGLEBERG, N.C., EINSENSTEIN, B.I., MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHERRER, D., CORTI, S., MUEHLHERR, J.E., ZWEIFEL, C. & STEPHAN, R. Phenotypic and genotyping characteristics of Staphylococcus aureus isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.101, p.101-107, 2004.

SCHLEGELOVA, J., DENDIS, M., BENEDIK, J., BABAK, V. & RYSANEK, D. Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.92, p.327-334, 2003.

SCHWARZKOP, A. & KARCH, H. Genetic variation in Staphylococcus aureus coagulase genes: potencial and limits for use an epidemiological marker. **J Clin Microbiol**, United States, v.32, p.2407-2412, 1994.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus spp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife (PE)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMG, Belo Horizonte, 2000.

SHAFER W.M. & IANDOLO, J.J. Staphylococcal enterotoxin A: a chromosomal gene product. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.36, p.389—91, 1978a

SHAFER, W.M. & IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infect Immun**, United States, v.20, p.273–8, 1978b.

SHALITA, Z., HERTMAN, I. AND SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B. production in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, United States, v.129, p.317–25, 1977.

SHULTZ, P. & RAIJ, L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. **J Clin Invest**, United States, v.90, p.1718–25, 1992.

SILVA JÚNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 479p.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of enterotoxin A, B e C genes in *Staphylococcus aureus* from goats and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.106, p.106-107, 2005.

SILVA, R. M. M. **Especificações microbiológicas para ambientes, manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFV, Viçosa, 1996.

SPICER, J.W. **Bacteriologia. Micologia e Parasitologia Clínica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 224p.

STEWART, A.W. Effect of cooking on bacteriological population of “soul foods”. **J Food Prot**, United States, v.46, p.19–20, 1983.

SU, C., HERBELIN, C., FRIEZE, N., SKARDOVA, O., SORDILLO, L.M. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. **Epidemiol Infect**, England, v.122, p.329–336, 1999.

SZEWCZYK, E. M. & ROZALSKZ, M. *Staphylococcus cohnii*-resident of hospital environment: cell-surface features and resistance to antibiotics. **Acta Microbiol Pol**, Poland, v.49, p.121-133, 2000.

TALAN, D.A., STAATZ, D., STAATZ, A., GOLDSTEIN, E.J., SINGER, K., OVERTURF, G.D. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. **J Clin Microbiol**, United States, v.27, p.78–81, 1989.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J.L.; DRAKE, M. Development of a Multiplex Polymerase Chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **J Food Prot**, United States, v.64, n.5, p.664-668. 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasil, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cell. Mol Life Sci**, Switzerland, v.56, p.755-763, 1999.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant works from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. **J Med Microbiol**, England, v.48, p.819-823, 1999.

VALLE, J., GOMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S., GOYACHE, J., ORDEN, J.A., VADILLO, S. Enterotoxin Production by Staphylococci Isolated from Healthy Goats. **Appl Environ Microbiol**, United states, v.56, n.5, p.1323-1326, 1990.

van BELKUM, A., RIEWARTS ERIKSEN, N.H., SIJMONS, M., van LEEUWEN, W., van DEN BERGH, M., KLUYTMANS, J., ESPERSEN, F. & VERBRUGH, H. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol**, England, v.46, p.222-232, 1997.

van HOLY, A. HOLZAPFEL, W.H., DRKES, G.A. - Bacterial populations associated with Vienna sausages packaging. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.9, p.45, 1992.

VANCRAEYNEST, D., HERMANS, K. & HAESEBROUCK, F. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains, **Vet Microbiol**, Netherlands, v.121, p.368–372, 2007.

VARNAN, A.H. & EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Mosby Year Book, 1991, p.235-265.

VARSHNEY, A.K.; MEDIAVILLA, J.R.; ROBIOU, N.; GUH, A.; WANG, X.; GIALANELLA, P.; LEVI, M.H.; KREISWIRTH, B.N.; FRIES, B.C. Diverse Enterotoxin Gene Profiles Among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates From the Bronx, New York. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.75, p.6839–6849, 2009.

VASILOPOULOS, C., RAVYTS, F., DE MAERE, H., DE MEY, E., PAELINCK, H., DE VUYST, L., LEROY, F. - Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. **J Appl Microbiol**, England, v.104, n.5, p.1341-1353, 2008.

VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, Brasil, v.17, p.218, 2003

VIEIRA-DA-MOTTA, O., FOLLY, M.M., SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different staphylococcus aureus strains in bovine milk from Subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Braz J Microbiol**, Brasil, v.32, p.27-31, 2001.

WEGRZYNOWICZ, Z., HECZKO, P.B., JELJASZEWICZ, J., NEUGEBAUER, M. & PULVERER, G. Pseudocoagulase activity of staphylococci. **J Clin Microbiol**, United States, v.9, p.15-19, 1979.

WERCKENTHIN, C., CARDOSO, M., MARTEL, J.L. & SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. **Vet Res**, England, v.32, p.341-362, 2001.

WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB e entC1 and thermonuclease gene nuc. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.57, p.1793-1798, 1991.

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

YOON, J.W., LEE, G.J., LEE, S.Y., YOO, J.H., PARK, H.M. Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. **Vet Dermatol**, England, v. 21, n.5, p.484-9, 2010.

ZELL, C., RESCH, M., ROSENSTEIN, R., ALBRECHT, T., HERTEL, C., GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.127, p. 246–251, 2008.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiol Lett**, England, v.168, p.227-233, 1998.

ZOCHE, F., BASTOS, C.P., SILVA, W.P. Detecção de genes do cluster egc em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. **Ciênc Rural**, Brasil, v.40, n.5, p.1134-1140, 2010.

VITA

I. Identificação

Nome: Tiane Martin de Moura

Endereço: Praça Conde de Porto Alegre, 77/93 Centro Porto Alegre/RS CEP 90.020-130

Idade: 30 anos

E-mail: tianedemoura@gmail.com

Tel.: 51 8201 7011

II. Documentação

Possui carteira de habilitação - categoria: B.

III. Formação profissional

2009 – atual: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

2000 – 2005: Graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas/RS.

IV. Formação complementar

2009 – 2010: Organização do III Simpósio de Microbiologia Aplicada e I Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada & IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. Local: UFRGS.

2004 – 2007: Curso de Inglês. Centro de Cultura Anglo Americano, Brasil

V. Outros conhecimentos

Compreensão escrita e oral da Língua Inglesa. Compreensão escrita e oral da Língua Espanhola.

Noções intermediárias sobre informática com bons conhecimentos de Office (Word, Excel, PowerPoint, Publisher) e internet.

VI. Experiência Profissional

2008 – 2008: Professor Substituto na Área de Alimentos. Faculdade de Nutrição/UFPEL

2006 – 2008: Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa - Nível Médio 2A CNPq vinculada ao projeto intitulado "*Imunodiagnóstico em Microbiologia Clínica e de Alimentos*"

2005 – 2006: Estágio profissional no Laboratório de Análise e Ensaio de Alimentos Laboratório de Ensaio e Análise de Alimentos/UFPEL. Carga horária: 2.412 horas.

VII. Prêmios

2008: Destaque XVII Congresso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação Categoria Poster, 1º lugar, Área da saúde.

VIII. Participação em bancas de trabalhos de conclusão

2007: Faculdade de Nutrição/UFPEL. Janise Pedroso Colembergue. "Avaliação da Qualidade Higiénico-Sanitária de Saladas de Alface Servidas em Restaurantes Tipo *Self-Service* de Pelotas, RS"; Camila Zuchetto. "Avaliação Microbiológica e Parasitária em Saladas de Agrião (*Rorippa Nasturtium-Aquaticum L.*) Servidos em Restaurantes do Tipo *Self-Service* de Pelotas, RS"; Deise Cristina Veleda Modesto. "Avaliação das Condições Higiénico-Sanitárias do Ambiente de Preparo de Refeições em uma Unidade de Alimentação e Nutrição Hospitalar".

2008: Faculdade de Nutrição/UFPEL. Luana Tombini Decol. "Validação do Processo de Higienização da Alface (*Lactuca Sativa L.*) Servida no Restaurante Escola da Universidade Federal de Pelotas no Campus Capão do Leão"; Ândria Sampaio Ortiz. "Validação do Processo de Transporte e Serviço das Preparações Arroz, Feijão e Carne do Restaurante Escola da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS"; Khadija Bezerra Massaut. "Validação dos Procedimentos de Higienização de Equipamentos, Utensílios e Superfícies da Área de Produção do Restaurante Escola (RE) - Centro da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

2009: Faculdade de Nutrição/UFPEL. Bianca Bittencourt De Souza. "Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do Sanitizante Hipoclorito de Sódio"; Eliza Marques Di Primio. "Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do Sanitizante Utilizado para Alimentos no Restaurante Escola da Universidade Federal de Pelotas/RS"; Andressa Silveira Victória. "Avaliação das Boas Práticas nas Áreas de Preparo e Distribuição da Merenda Escolar em Escolas da Rede Municipal de Ensino da Zona Urbana da Cidade de Pelotas/RS".