

**JULIANA DE CASTRO BELTRÃO DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DOS GENES *mecA* E *qacA/B* EM  
*STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

**PPGVS/INCQS**

**FIOCRUZ**

2010

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DOS GENES *mecA* E *qacA/B* EM  
*STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Juliana de Castro Beltrão da Costa**

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Prof. Dr. Victor Augustus Marin  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

Rio de Janeiro

2010

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DOS GENES *mecA* E *qacA/B* EM  
*STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Juliana de Castro Beltrão da Costa**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 24 de fevereiro de 2010

---

Profa. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas (INCQS/FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel (UFRJ)

---

Prof. Dr. Sergio Borges Mano (UFF)

Orientadores:

---

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

---

Profa. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (**in memoriam**)

Rio de Janeiro

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Juliana de Castro Beltrão da

Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal / Juliana de Castro Beltrão da Costa. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010.

xiv, 73 f.; il., tab.

Orientadores: Victor Augustus Marin; Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki  
Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

1. Queijo Minas Frescal 2. *mecA* 3. *qacA/B* 4. Antibiograma 5. *Staphylococcus* spp.

Evaluation of the profile of antimicrobial resistance and the presence of the genes *mecA* and *qacA/B* in *Staphylococcus* spp. isolated from “Minas Frescal” type cheese

Aos meus pais, Ana Maria de Castro Beltrão da Costa e  
José Beltrão da Costa, minha avó Maria Aparecida Venâncio e ao meu irmão  
Vitor de Castro Beltrão da Costa.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Victor Augustus Marin, pelos conhecimentos transmitidos, técnicos e de vida, e pelo encorajamento em diferentes momentos da realização desta dissertação.

À minha orientadora Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki, pela colaboração intelectual, prática e pela amizade que foram tão importantes para a elaboração deste trabalho. Saudades e lembranças queridas ficarão sempre em minha memória.

Às amigas Bruna Peres Sabagh, Aline da Silva Souto, Alessandra de Oliveira Abreu, Daniella Cristina Rodrigues e Louise Moreira Reis sempre solícitas e ajudando em pequenas coisas que fizeram toda a diferença. Além disto, pelas risadas e companheirismo que tornaram o trabalho mais prazeroso.

Às amigas Mariana Tavares Dias e Samara Pinto Custódio Bernardo, irmãs de orientação, pela troca de experiências de trabalho.

À Maria Helena Simões Villas Bôas pela colaboração tanto como coordenadora do curso na época de meu ingresso, quanto como pesquisadora na área de saneantes e revisora deste trabalho.

À Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, coordenadora da pós-graduação, pelos incentivos e conselhos.

Aos amigos da CPG/INCQS, Raquel Argento, Daniele Genteluci, Isac Macêdo e Pedro Lima, prestativos e eficientes.

Aos funcionários do departamento de microbiologia do INCQS, que com seu trabalho permitiram a conclusão desta dissertação, em especial a Cátia Cristina S. do Nascimento, sempre sorridente e disposta a ajudar.

À minha família querida, pelo constante incentivo e torcida para que este sonho se tornasse realidade.

Ao Rafael Lopes Almeida de Oliveira, pelo companheirismo, carinho e amizade em todos os momentos.

À Biblioteca do INCQS pela ajuda durante todo o período de realização do trabalho, em especial ao Alexandre Medeiros pela ajuda.

Aos profissionais de diferentes laboratórios que de alguma forma colaboraram com a execução prática da pesquisa desta dissertação.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia de Alimentos pelo incentivo para conclusão deste trabalho após a defesa de dissertação, especialmente à Sílvia Maria Lopes Bricio, pelas importantes contribuições e correções finais nesta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida a mim durante todo o período de meu mestrado.

## RESUMO

Diversos relatos indicam que queijos Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados, sendo o gênero *Staphylococcus* spp. incriminado em diversos surtos de toxinfecção alimentar. Os objetivos deste estudo são a pesquisa de características fenotípicas e genotípicas de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados a partir de queijo Minas Frescal, verificando a presença dos genes *mecA* e *qacA/B* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes isolados, caracterizadas como estafilococos coagulase positiva e estafilococos coagulase negativa por Freitas (2005), neste estudo passaram por verificação de sua pureza, através de características macroscópicas das colônias em crescimento em Tryptic Soy Agar, coloração de Gram, prova da catalase e da coagulase. Após a seleção de culturas puras de estafilococos foi realizado teste de suscetibilidade a antimicrobianos (mupirocina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina, sulfazotrim, norfloxacina, cefotaxima, piperacilina+tazobactam, meropenem, penicilina G, cefepima, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, oxacilina e cefoxitina), extração de DNA e pesquisa dos genes *mecA* e *qacA/B* através da reação em cadeia da polimerase. Os resultados foram que apenas 14 (14,7%) dos isolados analisados pelo antibiograma se mostraram sensíveis a todos os antibióticos testados. Encontrou-se 27 (28,4%) dos isolados multiresistentes e suscetíveis à meticilina e 15 (15,8%) eram multiresistentes e resistentes à meticilina. O gene *mecA* foi detectado em 21 (22,1%) dos 95 isolados pesquisados, e dentre estes, 9 (9,5%) apresentaram-se como resistentes pelo teste de suscetibilidade a antimicrobianos (incluindo dois isolados coagulase negativos). Dentre os isolados 74 (77,9%) não apresentaram o gene *mecA* e 6 (6,3%) apresentaram-se resistentes à meticilina pelo antibiograma. Foi utilizada estatística descritiva pelo cálculo de porcentagens com os dados obtidos na pesquisa. Demonstramos através desta pesquisa que o gene *qacA/B* não estava presente em nenhum dos isolados de estafilococos provenientes de queijo Minas Frescal. Os queijos Minas Frescal analisados neste estudo possuem isolados de *Staphylococcus* spp. com o potencial de resistir a tratamentos de antibioticoterapia caso consigam causar infecção ao consumidor através da ingestão, porém elimináveis dos ambientes de produção de alimentos pelo uso dos agentes desinfetantes a base de quaternários de amônio.



## ABSTRACT

Several reports indicate that cheese commercialized in Brazil are widely contaminated with the *Staphylococcus* spp. incriminated in several outbreaks of food poisoning. The objectives of this study are to search for phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from Minas Frescal type cheeses, verifying the presence of the *mecA* gene and *qacA/B* using the technique of polymerase chain reaction (PCR). These isolates were characterized as coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by Freitas (2005) and this study began by checking its purity by means of macroscopic features of colonies growing in Tryptic Soy Agar, Gram stain, tests of catalase and coagulase. After selection of pure cultures of staphylococci, these isolates were tested for susceptibility to antimicrobials (mupirocin, ampicillin, tetracycline, clindamycin, sulfazotrim, norfloxacin, cefotaxime, piperacillin + tazobactam, meropenem, penicillin G, cefepime, chloramphenicol, gentamicin, erythromycin, oxacillin and ceftiofur), DNA extraction and research of the genes *mecA* and *qacA/B* by polymerase chain reaction. The results were that only 14 (14.7%) isolates analyzed by antibiotic susceptibility were sensitive to all antibiotics tested. 27 (28.4%) of multiresistant strains were methicillin-susceptible and 15 (15.8%) were multidrug resistant and resistant to methicillin. The *mecA* gene was detected in 21 (22.1%) of 95 isolates studied, and of these, nine (9.5%) were resistant to the antimicrobial susceptibility testing (including two isolates of coagulase-negative). Among the isolates, 74 (77.9%) showed the *mecA* gene and 6 (6.3%) were resistant to the antibiotic methicillin. Descriptive statistics were used for calculating percentages with data obtained in this search. We demonstrated through this research that the gene *qacA/B* were not present in any of staphylococcal isolates from Minas Frescal type cheeses. The Minas Frescal type cheese analyzed in this study had *Staphylococcus* spp. with the potential to resist antibiotic treatment if they can cause infection to consumer through ingestion, but eliminable of the environments of food production through the use of disinfecting agents based on ammonium quaternary.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL– Microlitro

IPCS - Infecções primárias de corrente sanguínea

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CFO - Cefoxitina

CLI - Clindamicina

CLO - Cloranfenicol

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CPM - Cefepima

CSM - Componentes de Superfície Microbiana

CTX - Cefotaxima

ERI - Eritromicina

Eta e Etb - Toxinas esfoliativas

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Gramas

GEN - Gentamicina

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

L – Litro

MER - Meropenem

mL – Mililitro

MRS – Methicillin-resistant *Staphylococcus* (estafilococos resistentes à meticilina)

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina)

MUP - Mupirocina

NaCl - Cloreto de sódio

NOR - Norfloxacin

°C – Graus Celsius

OXA - Oxacilina

PCR – Polimerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PEN – Penicilina G

PLP - Proteína ligadora de penicilina

POP – Procedimento Operacional Padrão

PPT - Piperacilina+tazobactam

QAC – Quaternary ammonium compounds (compostos à base de quaternário de

amônio)

RDC - Resolução Colegiada

Rede RM - Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde

*S.aureus* - *Staphylococcus aureus*

SCC*mec* - Staphylococcal Cassete Chromosome *mec* (cassete cromossomal *mec* estafilocócico)

SCN – *Staphylococcus* coagulase negative (estafilococos coagulase negativas)

SE - Enterotoxina

SIRVETA - Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe

SUS – Sistema Único de Saúde

SUT - Sulfametoxazol-trimetoprim

TET - Tetraciclina

TSA - Tryptic Soy Agar

TSB - Tryptic Soy Broth

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

VAN - Vancomicina

VE-DTA - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos

VRSA - Cepa de *S.aureus* resistente à Vancomicina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Perfil global de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados *Staphylococcus* spp. obtidos de queijo Minas Frescal relacionando número de isolados com antibióticos testados.....36
- FIGURA 2.** Produto da amplificação do gene *mecA* obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR).....37
- FIGURA 3.** Produto da amplificação do gene *qacA/B* obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR).....38

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Seqüências dos oligonucleotídeos (primers) a serem utilizadas para as ampliações dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* isolados de queijo Minas Frescal.....23

**TABELA 2** Presença dos genes *mecA*, *qacA/B* e *femA* e do fenótipo de resistência a oxacilina e ceftoxitina nos isolados de *Staphylococcus* spp.....42

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Relatos de surtos de intoxicação atribuídos ao consumo de produtos lácteos contaminados com <i>Staphylococcus aureus</i> no Brasil no período de 1993-2002, registrados no Sistema de Informação para a Vigilância das Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA).....	5
QUADRO 2. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A2.....	27
QUADRO 3. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A3.....	28
QUADRO 4. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A5 e A11.....	29
QUADRO 5. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A21e A22.....	30
QUADRO 6. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A27.....	31
QUADRO 7. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A28 e A30...	32
QUADRO 8. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. com fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A11 e A25...	33
QUADRO 9. Nível de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos de queijo Minas Frescal.....	34
QUADRO 10. Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos de queijos Minas Frescal.....	35
QUADRO 11. Presença dos genes <i>mecA</i> , <i>qacA/B</i> , <i>femA</i> e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A2, A3 e A5.....	39
QUADRO 12. Presença dos genes <i>mecA</i> , <i>qacA/B</i> , <i>femA</i> e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A11, A21, A22 e A25.....	40
QUADRO 13. Presença dos genes <i>mecA</i> , <i>qacA/B</i> , <i>femA</i> e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A28 e A30.....	41

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Queijo Minas Frescal e a colonização pelo gênero <i>Staphylococcus</i> spp .....	1
1.2 <i>Staphylococcus</i> spp. como agente de infecções .....	6
1.3 Resistência aos antimicrobianos e biocidas por <i>Staphylococcus</i> spp.....	6
1.4 Resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. aos antimicrobianos em alimentos.....	13
1.5 Resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. aos biocidas em alimentos.....	14
1.6 Critérios microbiológicos para alimentos.....	15
1.7 Vigilância Sanitária como instrumento de proteção da população.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos Gerais.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Verificação da viabilidade e pureza dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
3.1.1 Produção da enzima catalase.....	20
3.1.2 Produção da enzima coagulase.....	20
3.2 Preparação do estoque das amostras bacterianas.....	21
3.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	21
3.4 Extração de DNA.....	22
3.5 Pesquisa dos genes <i>mecA</i> e <i>qacA/B</i> através da reação em cadeia da polimerase..	22
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Verificação da viabilidade e pureza de <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
4.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	24
4.3 Pesquisa dos genes <i>mecA</i> , <i>qacA/B</i> através da reação em cadeia da polimerase e sua relação com o gene <i>femA</i> pesquisado por Freitas (2005) .....	25
5 DISCUSSÃO.....	43
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO A - Meios de Cultura.....</b>	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Queijo Minas Frescal e a colonização pelo gênero *Staphylococcus* spp.

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil, onde um dos tipos de maior consumo é o Minas Frescal (BEHMER, 1991). A partir da década de 80, o volume de produção do queijo Minas Frescal superou o do queijo minas curado, que até então representava menos de 1/3 do total fabricado dentre as duas variedades (SANTOS, 2004). Entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). É um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 2004).

No processo tradicional de fabricação do queijo Minas Frescal, uma cultura específica de bactérias ácido-lácticas é adicionada, promovendo proteção microbiológica pela competição com patógenos pelo nicho de crescimento, aumentando a atividade de coagulação e facilitando a remoção do soro (FOX et al., 2000). Evoluindo a partir deste processo tradicional, a adição de cultura láctica foi substituída pela adição de ácido láctico industrial, denominado processo de acidificação direta, para aumentar o rendimento de queijo Minas Frescal e reduzir as alterações físico-químicas durante sua vida útil. Mais recentemente foi introduzido também o processo de ultrafiltração, utilizando o método do líquido pré-queijo desenvolvido por Maubois, Mocquot e Vassal (MAUBOIS e MOCQUOT, 1975). Este método permite a produção de queijo Minas Frescal pela coagulação direta do líquido “pré-queijo”, adicionando coalho na sua embalagem comercial final. Uma quantidade consideravelmente menor de coalho é necessária pois o processo de ultrafiltração aumenta a produtividade através da concentração da gordura e proteínas (a lactoalbumina e lactoglobulina são retiradas com a caseína nas membranas de ultrafiltração). Não há adição de cultura “starter” neste processo, somente a adição de ácido láctico. O processo de ultrafiltração também aumenta as condições higiênicas do produto devido ao seu circuito fechado de processamento (CARVALHO, VIOTTO e KUAYE, 2007).

O leite a ser utilizado deve ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente combinado ou não com outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto (BRASIL, 1997). Sua massa é crua, com alto teor de umidade (46-55%) e não maturada, que deve ser consumido nos primeiros quinze dias após sua fabricação, sendo, portanto, um produto altamente perecível (HOFFMAN, SILVA e VINTURIM, 2002 apud LISITA, 2005).



Os problemas com a produção de queijos no Brasil estão relacionados com as precárias condições do leite produzido, as péssimas condições de fabricação dos queijos (em especial o Minas Frescal) e a falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva que agravam a situação e criam condições de contaminação e desenvolvimento de micro-organismos em diferentes etapas (LISITA, 2005). Além disso, os funcionários que manipulam o produto nas fábricas podem ser portadores de agentes microbianos patogênicos e representarem um elo na cadeia epidemiológica dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (BRYAN, 1998). Em geral, manipuladores de alimentos apresentam múltiplas cepas de *Staphylococcus aureus* nas narinas e mãos (ANDRÉ et al., 2008).

Diversos relatos indicam que queijos Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados (ROCHA, BURITI e SAAD, 2006), incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *Aeromonas* (SABIONE e MAIA, 1998; SILVA, HOFFER e TIBANA, 1998; ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2000; BULHÕES e ROSSI JÚNIOR, 2002 apud ROCHA, BURITI e SAAD, 2006). Em muitos países *S. aureus* é considerado o segundo ou terceiro patógeno mais comum responsável por surtos de intoxicação alimentar (ATANASSOVA, MEINDL e RING, 2001 apud VERAS et al., 2008).

O gênero *Staphylococcus* produz catalase, e são bactérias coagulase positivas ou negativas dependendo da espécie (KLOSS e LAMBE, 1991). É atualmente composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUSÉBY, 2009) que podem ser patogênicas, saprofíticas ou usadas na indústria de alimentos como culturas “starter” ou iniciadoras (IRLINGER, 2008). Em relação a toxinas, *S. aureus* pode produzir um amplo repertório de mais de 18 tipos de enterotoxinas (SE), exibindo propriedades superantigênicas, com algumas diferenças estruturais e de atividade biológica (THOMAS et al., 2007 apud FISCHER et al., 2009). O gênero *Staphylococcus* spp. pode produzir uma ou mais toxinas da família de enterotoxinas estafilocócicas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (MCCORMICK, YARWOOD e SCHLIEVERT, 2001 apud CHIANG et al., 2008), além de toxinas esfoliativas (Eta e Etb) (MEHROTRA, WANG e JOHSON, 2000). Cinco tipos clássicos de enterotoxinas, de SEA até SEE (DINGES, ORWIN E SCHLIEVERT., 2000 apud CHIANG et al., 2008) e muitos tipos novos de SE como SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU já foram relatados (SU e WONG, 1995; MUNSON et al., 1998; ZHANG, IANDOLO e STEWART, 1998; FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al., 2001; KURODA et al., 2001; NOVICK, SCHLIEVERT e RUZIN, 2001; ORWIN et al., 2001; ORWIN et al., 2002; YARWOOD et al., 2002; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003; ORWIN et al., 2003; OMOE et al., 2004; apud CHIANG et al, 2008). Outros tipos de enterotoxinas já foram citados por Omoe et al. (2005) e Borges et al. (2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estipula os estafilococos coagulase positiva como os únicos produtores de enterotoxinas do grupo de estafilococos a serem pesquisados em alimentos, porém os estafilococos coagulase-negativa (SCN) capazes de produzir enterotoxinas já foram isolados de surtos de intoxicação alimentar (OLSVIK, FOSSUM e BERDAL, 1982; KREISWIRTH, SCHLIEVERT e NOVICK, 1987; ORDEN et al., 1992; UDO et al., 1999; VERNOZY-ROZAND et al., 1996; MIWA et al., 2001; BLAIOTTA et al., 2004; apud VERAS et al., 2008). A existência de linhagens coagulase-negativas produtoras de SE já foi observada há algum tempo como relatado por Bautista e Taya em 1988, sobre surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus epidermidis*. Embora muitas espécies coagulase negativas sejam adaptadas principalmente a hospedeiros não-humanos, não se exclui a possibilidade desses micro-organismos contaminarem alimentos para humanos e serem produtoras de SE (JAY, 2005).

Dentre os estafilococos coagulase-positiva, a espécie *S. aureus* se destaca pela incidência em surtos de intoxicação alimentar. Esse micro-organismo é capaz de crescer em uma ampla variação de temperaturas, pH e em elevadas concentrações de cloreto de sódio, conforme Le Loir, Baron e Gautier (2003), correspondendo a mais de 15% de NaCl. Estas características de *S. aureus* permitem que tenham capacidade de colonizar uma grande variedade de alimentos e podem explicar a sua ocorrência em alimentos que passem por manipulação durante seu processamento, incluindo alimentos fermentados como os queijos (LE LOIR, BARON e GAUTIER, 2003) e alimentos salgados, devido a sua halotolerância.

Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA), entre 1993 e 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos com acometimento de 4.247 pessoas em 11 países dessa região, sendo que entre 1996 e 2002 há 18 relatos de surtos causados por queijos ocorridos no Brasil, com 93 pessoas acometidas conforme pode ser observado no quadro 1 (INPPAZ/OPS/OMS, 2006). Segundo o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis por alimentos (VE-DTA), no período de 1999 até 2004, foram notificados pelo Ministério da Saúde 3.737 surtos, com acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Dos 3.737 surtos, 80% foram encerrados sem dados sobre o agente etiológico, 8,4% foram identificados pelo critério clínico-epidemiológico e somente 15,5% foram identificados pelo critério laboratorial clínico e/ou bromatológico. Destes, 34,7% foram causados por *Salmonella* spp., seguida por *S. aureus* (11,7%) e o restante por outros agentes (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2005).

Carmo et al. (2002) relataram a ocorrência de dois surtos de intoxicação estafilocócica

causados pelo consumo de queijo Minas Frescal e leite cru, ocorridos em Manhuaçu e Passa Quatro (MG) e notificados ao serviço de Vigilância Sanitária em fevereiro e março de 1999. O primeiro surto envolveu 50 pessoas e as amostras de queijo Minas Frescal e leite cru inicial apresentaram contagens de *S. aureus* de  $2,4 \times 10^3$  a  $2,0 \times 10^8$  UFC/g e presença de enterotoxinas SEA, SEB e SEC. No segundo surto, o consumo de leite cru foi a causa das intoxicações alimentares e contagem de estafilococos coagulase negativa foi superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL, além de serem detectadas as enterotoxinas SEC e SED, o que atingiu 328 pessoas (BORGES et al., 2008). Através das enterotoxinas específicas encontradas pode-se identificar que no primeiro surto a provável fonte de contaminação para o alimento foram os manipuladores de alimentos e no segundo caso foram vacas leiteiras em processo de mastite (CARMO et al., 2002).

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem geralmente dentro de quatro horas após a ingestão dos alimentos contaminados, embora intervalos de 1 a 6 horas tenham sido relatados. Os sintomas são náusea, câibras abdominais, diarreia, dor de cabeça, sudorese, prostração e, algumas vezes, uma queda na temperatura corporal, que geralmente têm duração de 24 a 48 horas (JAY, 2005).

**Quadro 1-** Relatos de surtos de intoxicação atribuídos ao consumo de produtos lácteos contaminados com *Staphylococcus aureus* no Brasil no período de 1993-2002, registrados no Sistema de Informação para a Vigilância das Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA)

<b>Ano</b>	<b>Alimento</b>	<b>Cidade</b>	<b>N° de pessoas acometidas</b>
1996	Queijo	Belo Horizonte- MG	3
1996	Queijo	Belo Horizonte- MG	8
1996	Queijo mussarela	Belo Horizonte- MG	3
1999	Leite	Belo Horizonte- MG	3
1999	Queijo colonial	Arapongas- PR	7
1999	Leite	Curitiba- PR	4
1999	Queijo	Curitiba- PR	3
1999	Queijo	Curitiba- PR	4
1999	Queijo	Curitiba- PR	4
1999	Queijo	P. Fontim-PR	5
1999	Queijo	Viamão- RS	4
2000	Queijo	Rio Grande- RS	12
2000	Queijo	Caxias do Sul-RS	8
2000	Queijo colonial	Quedas do Iguaçu- PR	4
2000	Queijo	Itapajé- CE	7
2000	Queijo colonial	Porto Alegre- RS	3
2000	Queijo	Fortaleza-CE	7
2002	Queijo	Autazes-AM	4

Fonte: INPPAZ/OPS/OMS (2006)

## **1.2 *Staphylococcus* spp. como agente de infecções**

Além da intoxicação alimentar tendo como agente etiológico micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, estes micro-organismos também possuem a capacidade de causar desde quadros de infecções localizadas até septicemias, em casos mais graves.

O arsenal de virulência de *S. aureus* é extenso, com a ação de produtos estruturais e secretados, desempenhando um papel na patogênese da infecção. Ao estabelecer uma infecção, *S. aureus* possui inúmeras proteínas de superfície, chamadas de componentes de superfície microbiana (CSM) que reconhecem moléculas adesivas da matriz e são responsáveis pela aderência aos tecidos, ligando-se a moléculas como o colágeno, fibronectina e fibrinogênio. Os CSM parecem desempenhar um papel fundamental no início das infecções endovasculares, dos ossos e infecções comuns. Cepas diferentes de *S. aureus* podem ter diversos tipos de CSM e por isso podem ser predispostas a causar diferentes tipos de infecção (PATTI et al., 1994; TUNG et al., 2000 apud GORDON e LOWY, 2008).

Uma vez *S. aureus* aderido ao tecido hospedeiro estará apto a se multiplicar e persistir através de diversos mecanismos. Pode ocorrer a formação de biofilmes (DONLAN e COSTERTON, 2002 apud GORDON e LOWY, 2008) e de pequenas colônias, o que pode contribuir para infecção persistente ou recorrente (KAHL et al., 1998; PROCTOR e PETERS, 1995 apud GORDON e LOWY, 2008). Além disso, *S. aureus* possui diversos fatores para ajudar na fuga do sistema imune hospedeiro (GORDON e LOWY, 2008).

Durante a infecção, *S. aureus* produz inúmeras enzimas, como as proteases, lipases e elastases, que lhe permitem invadir e destruir tecidos do hospedeiro e se espalhar pelo organismo. *S. aureus* é também capaz de produzir choque séptico (BHAKDI e TRANUN-JENSEN, 1991; TIMMERMAN et al., 1993; LOWY, 1998 apud GORDON e LOWY, 2008), síndrome de choque tóxico (DINGES, ORWIN e SCHLIEVERT, 2000; MC CORMICK, YARWOOD e SCHLIEVERT, 2001 apud GORDON e LOWY, 2008), síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso (PRÉVOST, COUPPIÉ e MONTEIL, 2003 apud GORDON e LOWY, 2008).

## **1.3 Resistência aos antimicrobianos e biocidas por *Staphylococcus* spp.**

A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública que é afetado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e em animais, tendo como consequência o desenvolvimento e propagação deste tipo de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Algumas espécies de bactérias apresentam resistência natural/intrínseca ou resistência adquirida a estas substâncias. A resistência natural pode

ocorrer por variação da permeabilidade da parede celular para diferentes drogas, produção de enzimas que degradam ou modificam as drogas, e modificação espontânea de cromossomas de genes alvos dos antimicrobianos (NIKAIDO, 1994; KWON et al., 1995; NATAL, 2002). A resistência adquirida ocorre pela aquisição de genes de resistência (normalmente situados em elementos transmissíveis, como plasmídios ou transposons), por recombinação de DNA exógeno no cromossomo da bactéria ou ainda por mutação (NETO e DE ALMEIDA, 2006). O termo antimicrobiano é frequentemente utilizado para se referir a antibióticos e quimioterápicos e este será também o seu uso neste estudo

Nas últimas décadas o perfil de resistência a agentes antimicrobianos mudou drasticamente, principalmente devido ao aumento da prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina, assim como o aumento dos níveis de resistência antimicrobiana em muitas espécies de bactérias Gram-negativas (CHASTRE, 2008). Historicamente, a resistência às penicilinas estáveis na presença de penicilinases tem sido denominada “resistência à meticilina”, assim, os acrônimos MRSA (para *S. aureus* resistente à meticilina) ou SRM (para estafilococos resistente à meticilina) ainda são normalmente usados, embora a meticilina não seja mais o agente de escolha para testes ou tratamentos (CLSI, 2003).

A meticilina, primeira penicilina semi-sintética resistente à penicilinase, foi introduzida em 1961 para combater linhagens de *S. aureus* produtoras de penicilinase (LOWY, 2003). A resistência à meticilina ocorre na sequência da aquisição de mutações no DNA cromossômico, com o aparecimento de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), com a capacidade de produção de uma nova proteína ligadora de penicilina (PLP), denominada PLP2' ou PLP2a, com baixa afinidade pelos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, o que conseqüentemente confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (ROSSI et al., 1985; LYON e SKURRAY, 1987; DE JONGE et al., 1992). A PLP2a é codificada pelo gene *mecA* que está localizado em um grande segmento de DNA inserido ao DNA cromossomal e conhecido como região *mec*, gene *mec*, ou atualmente denominada cassete cromossomal *mec* estafilocócico (*Staphylococcal Cassete Chromosome mec/ SCCmec*) (LIVEMORE, 2000; HIRAMATSU et al., 2001). O reservatório inicial de *SCCmec* é incerto, porém ele pode ter advindo de espécies de estafilococos coagulase-negativas (WU et al., 1996; WISPLINGHOFF et al., 2003 apud GORDON e LOWY, 2008). Não há um gene homólogo ao *mecA* em cepas susceptíveis aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (CHAMBERS, 1997).

Ambas as cepas susceptíveis e resistentes de *S. aureus* produzem quatro maiores grupos de PLPs, as PLPs 1, 2, 3 e 4 (GEORGOPAPADAKOU e LIU, 1980; REYNOLDS, 1988 apud CHAMBERS, 1997). As PLPs são proteínas associadas à membrana que funcionam como transpeptidases, como carbopeptidases e em poucos casos demonstram atividade de

transglicosilases (NAVRATNA et al., 2009). Estas enzimas catalisam a reação de transpeptidação, promovendo ligações cruzadas entre os peptidoglicanos da parede celular bacteriana. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são substratos análogos que covalentemente se ligam ao sítio ativo serina das PLPs, inativando as enzimas em concentrações que são aproximadamente as mesmas das concentrações mínimas inibitórias administradas dos antibióticos. As PLPs 1, 2 e 3, que têm alta afinidade para a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, são essenciais para o crescimento celular, para a sobrevivência de cepas sensíveis e a ligação de  $\beta$ -lactâmicos a elas é letal para a célula bacteriana (GEORGOPAPADAKOU, DIX e MAURIZ, 1986; REYNOLDS, 1988; CHAMBERS e SACHDEVA, 1990 apud CHAMBERS, 1997). Nas células meticilina resistentes, a PBP2a, com baixa afinidade para ligação a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (BROWN e REYNOLDS, 1980; HAYES et al., 1981; HARTMAN e TOMASZ, 1984; UTSUI e YOKOTA, 1985 apud CHAMBERS, 1997) pode agir como uma substituta para funções essenciais das PLPs originais em concentrações nas quais os antibióticos seriam letais (CHAMBERS, 1997).

As cepas MRSA são normalmente resistentes a muitos antibióticos, como a eritromicina, aminoglicosídeos, mupirocina e quinolonas, além das penicilinas penicilinase-resistentes e cefalosporinas (AYLIFFE et al., 1998 apud AYLIFFE, 2001). Seguindo a disseminação das cepas MRSA, os glicopeptídeos (usualmente a vancomicina e mais recentemente a teicoplanina) se tornaram a base do tratamento para infecções por este patógeno. A vancomicina foi introduzida em 1958, mas uma cepa de *S. aureus* totalmente resistente a este antibiótico (VRSA) foi achada em 2002 (SIEVERT et al., 2002 apud SCHITO, 2006). Antes disso, cepas de *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina foram isoladas, primeiro no Japão em 1996 e depois em outros países, como o Estados Unidos (SCHITO, 2006).

As cepas resistentes à meticilina podem possuir natureza heterogênea, com o nível de resistência variando de acordo com as condições de cultura das bactérias e o tipo de antibiótico  $\beta$ -lactâmico que está sendo usado. A maioria das células em colônias heterogêneas (tipicamente 99% ou mais) é suscetível a pequenas concentrações de  $\beta$ -lactâmicos (1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ ), com apenas uma pequena proporção das células crescendo em concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$  de meticilina ou mais. A maioria dos isolados clínicos exibem o padrão heterogêneo de resistência em condições rotineiras de crescimento. As cepas heterogêneas podem, no entanto, aparecer homogêneas em determinadas condições de cultivo. Estas alterações na expressão da resistência com diferenças nas formas de cultivo são transitórias. A passagem de cepas heterogêneas em contato com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos altera o fenótipo de resistência

pela seleção de cepas mutantes de clones bacterianos altamente resistentes (SABATH e WALLACE, 1974; CHAMBERS e HARCKBARTH, 1987; apud CHAMBERS, 1997). Esses clones produzem uma população homogênea de células altamente resistentes que pode crescer em concentrações de meticilina de 50 a 100µg/mL, porém essas características tendem a ser instáveis nestes clones selecionados em laboratório. Com repetições de sub-culturas em meio de cultura livre de antibióticos, a proporção de células altamente resistentes gradualmente diminui e o padrão heterogêneo reaparece (CHAMBERS, 1997).

A maioria das cepas clínicas de MRSA possui tipos heterólogos de expressão de resistência para meticilina. Foi demonstrado que, além de *mecA* e de genes regulatórios na expressão de altos níveis de resistência à meticilina, cerca de 20 genes cromossomais estão envolvidos (KOPP et al., 1996). Um destes fatores, conhecidos como gene *fem* (factors essential for methicillin resistance) ou gene *aux* (auxiliary), está diretamente envolvido na biossíntese da parede celular bacteriana ou na síntese de fatores associados, além de influenciar o nível de resistência a meticilina (BENSON et al., 2002). Três desses genes, *femX*, *femA* e *femB*, desempenham um papel vital nos estágios posteriores à síntese de peptidoglicano da parede celular dos estafilococos e, por essa razão, podem servir como alvos apropriados para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (BENSON et al., 2002). Inserções mutagênicas nestes genes levam a produção de mutantes sensíveis a meticilina a partir de cepas originalmente resistentes. A inativação de *femA*, *femB* ou *femX* abole completamente a resistência à meticilina, enquanto que a inativação em outros fatores reduzem o nível de resistência, mas ainda permitem a reversão para cepas resistentes. A inativação destes fatores em uma cepa suscetível leva a hiper sensibilidade para β-lactâmicos (KOPP et al., 1996). Ao contrário do gene *mecA*, o operon *femA-femB* está presente tanto no genoma de *S. aureus* resistente à meticilina quanto no de cepas susceptíveis a este antibiótico (VANNUFEL, 1999).

Vários testes moleculares desenhados para detectar *femA* em *S. aureus* falharam na amplificação de sua sequência homóloga nos SCN, mas há evidências da presença de um gene estruturalmente relacionado com o *femA* dos *S. aureus* em *S. epidermidis*. Estes dados foram confirmados através da completa identificação e sequenciamento do *Open Reading Frame* (ORF) dos genes *femA* e *femB* em *S. epidermidis* e *S. simulans* (dados originários do Gene Bank). Ao contrário da aproximada identidade dos genes *mecA* em *S. aureus* e nas cepas SCN, os genes *femA* e *femB* de *S. aureus* e de *S. epidermidis* exibem aproximadamente 20-22% de divergência, o que não ocorre com o arranjo genômico do operon *femA-femB* dos *S. epidermidis* que é aproximadamente idêntico ao encontrado nos *S. aureus*. A ligação intra- e interespecies desses genes e a conservação da organização genômica são, por essa razão,



consistentes com a cópia de um desses genes em um organismo ancestral e com a possibilidade da conservação filogenética do *femA* em todas as espécies estafilocócicas (VANNUFEL, 1999 apud FREITAS, 2005).

Em julho de 2006, a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) iniciou o monitoramento do perfil de sensibilidade de agentes prioritários de infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS) em pacientes de terapia intensiva. Até junho de 2008, 97 hospitais participaram de alguma forma no envio mensal de dados de sensibilidade. No período de julho de 2006 até junho de 2008 foram totalizadas 5.406 notificações de isolados obtidos a partir de IPCS, sendo que destes isolados os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* corresponderam em média a 47% de todas as notificações de IPCS enviadas, os SCN a 29% e *S. aureus* a 18% de total. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* representaram 13% do total de notificações, seguidos por *Pseudomonas aeruginosa* (11%), *Acinetobacter* (11%), *Enterobacter* (6%), *Enterococcus* (5%), *Candida* (4%) e *Escherichia Coli* (3%). Entre 2.406 micro-organismos do gênero *Staphylococcus* testados para oxacilina, foi verificada a sensibilidade em apenas 20% de SCN (número = 1483) e em 39% de *S. aureus* (número = 897) nos 24 meses do monitoramento, variando entre 36% (jul-dez/2007) e 42% (jan-jun/2007) (ANVISA, 2009).

Além da utilização de antibióticos e quimioterápicos, existe uma outra classe de agentes, os desinfetantes, que são amplamente utilizados em ambientes de saúde, locais de preparo de alimentos e domicílios (SIDHU et al., 2002). Desinfetantes são definidos através da Resolução nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 como produtos que matam todos os micro-organismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas, e os sanitizantes como agentes ou produtos que reduzem o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde. Essa resolução se refere a produtos com ação antimicrobiana para a indústria alimentícia e afins, limitando-se por tipo e âmbito de aplicação a produtos destinados exclusivamente à sanitização/desinfecção de superfícies e equipamentos que entram em contato com o alimento, somente permitindo o uso das substâncias constantes da lista do Code of Federal Regulation nº 21 parágrafo 178.1010 e as da Diretiva nº 98/8/CE, obedecendo as respectivas restrições e suas atualizações (BRASIL, 2007). Dentre esta lista os produtos à base de quaternário de amônio estão incluídos.

O termo biocida é também muito utilizado na literatura para se referir aos desinfetantes. Biocida, por definição, é o agente físico ou químico, não quimioterápico, que mata todas as formas vivas de organismos, micro e macro, porém o termo é normalmente utilizado para se referir aos micro-organismos (BLOCK, 2001 apud MIYAZAKI, 2006).

Os biocidas à base de quaternário de amônio (QAC) são largamente utilizados em indústrias de alimentos por apresentarem ação surfactante (MIYAGI, TIMENETSKY e ALTERTHUM, 2000). Esses compostos são considerados antimicrobianos de pequeno espectro de ação, por agirem sobre bactérias não esporuladas, fungos e vírus com envoltório lipídico, inativando-os, não sendo, porém, capazes de inativar esporos bacterianos, micobactérias e vírus sem envoltório (MCDONELL e RUSSEL, 1999).

A interação entre o biocida e os micro-organismos segue uma sequência de eventos na qual o biocida primeiramente se liga à superfície microbiana, em seguida penetra na parede celular, entra no citoplasma, onde ele poderá interagir com proteínas celulares e ácido nucleico. A ação letal resulta da lesão à célula causada pelo biocida em algum momento deste processo. Alguns dos agentes são ativos para membrana, como é o caso dos biocidas à base de quaternário de amônio, que desestruturam a membrana celular por interação física com componentes da mesma, permitindo o extravasamento do conteúdo vital da célula (LAMBERT, 2004).

O uso de desinfetantes tem levado à emergência de MRSA com decréscimo de suscetibilidade a estes agentes (NOGUSHI et al., 1999; MAYER et al., 2001; ALAM, ISHINO e KOBAYASHI, 2003; ALAM et al., 2003; NOGUCHI et al., 2005 apud NOGUCHI et al., 2006). Pelo menos 12 tipos de genes codificando para a resistência a desinfetantes já foram identificados nas espécies de estafilococos (*qacA/B* a *qacJ*, *smr* e *norA*) (ROUCH et al., 1990; PAULSEN et al., 1996; GRINIUS et al., 1992; HEIR, SUNDHEIM e HOLK, 1998; HEIR, SUNDHEIM e HOLK, 1999; BJORLAND et al., 2003 apud NOGUCHI et al., 2006). Quatro genes de resistência a desinfetantes, *qacA*, *qacB*, *smr* e *norA*, são encontrados principalmente em isolados clínicos de *S. aureus* (MAYER et al., 2001; ALAM, ISHINO e KOBAYASHI, 2003; ALAM et al., 2003; NOGUCHI et al., 2005 apud NOGUCHI et al., 2006) e estão associados com resistência a agentes catiônicos monovalentes, tais como compostos quaternários de amônio e brometo de etídio (LITTLEJOHN et al., 1992; PAULSEN et al., 1996; PUTMAN, VAN VEEN e KONINGS, 2000; ALAM, ISHINO e KOBAYASHI, 2003; ALAM et al., 2003; NOGUCHI et al., 2005; apud NOGUCHI et al., 2006). O *qacA*, *qacB*, e *smr* são encontrados principalmente em plasmídeos (TENNENT et al., 1989; LITTLEJOHN et al., 1991 apud NOGUCHI et al., 2006), e *norA* está localizado no cromossomo de *S. aureus* (NG, TRUCKSIS e HOOPER, 1994; YOSHIDA et al., 1990 apud NOGUCHI et al., 2006). O genes *qacA* e *qacB* codificam uma proteína transmembrana que pertence à maior superfamília facilitadora (ROUCH et al., 1990; PUTMAN, VAN VEEN e KONINGS, 2000; apud NOGUCHI et al., 2006). A resistência de *S. aureus* aos biocidas catiônicos ocorre por um mecanismo de bomba de efluxo de drogas dependente da força

próton motora e este mecanismo envolve os genes *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *smr* e *ebr* (PUTMANN, VAN VEEN e KONINGS, 2000 apud NOGUCHI et al., 2006).

Embora *qacA* confira maior resistência a agentes divalentes catiônicos do que *qacB*, a sequência de *qacB* é idêntica à do *qacA* exceto para apenas sete ou nove pares de bases (PAULSEN et al., 1996; ALAM et al., 2003; apud NOGUCHI et al., 2006), tornando difícil distinguir os genes *qacA* e *qacB* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo estes dois genes então considerados o mesmo. O gene *smr*, que é idêntico aos genes *qacC*, *qacD*, e *ebr*, e codifica uma pequena proteína que pertence a uma pequena família de multiresistência a antimicrobianos (LITTLEJOHN et al., 1991; LEELAPORN et al., 1995; PUTMANN, VAN VEEN e KONINGS, 2000 apud NOGUCHI et al., 2006). Desta forma, os genes plasmidiais de resistência aos desinfetantes são classificados em duas famílias, *qacA/B* e *smr* (PUTMANN, VAN VEEN e KONINGS, 2000). O gene de resistência cromossômica *norA* confere baixo nível de resistência à fluoroquinolonas hidrofílicas, como a norfloxacin e a levofloxacin, bem como aos desinfetantes (YOSHIDA et al., 1990; NOGUCHI et al., 2004; apud NOGUCHI et al., 2006). Em comparação com o gene *qacA/B*, as transcrições de *norA* são consideradas de pouca contribuição para a resistência aos agentes catiônicos. O gene *qacA/B* tem sido associado com alto nível de resistência a desinfetantes e a ser amplamente prevalente entre MRSA isolados na Europa e na Ásia (NOGUSHI et al., 1999; MAYER et al., 2001; ALAM et al., 2003; NOGUCHI et al., 2005 apud NOGUCHI et al., 2006). Portanto, o gene *qacA/B* tornou-se o maior gene de resistência a desinfetantes em cepas MRSA (NOGUCHI et al., 2006).

Os determinantes de resistência *qac* estão associados a transposons contendo genes de resistência à gentamicina, trimetoprim, penicilina, canamicina e tobramicina (SIDHU et al. 2002). A introdução de antibióticos na prática clínica levou ao desenvolvimento e disseminação de micro-organismos apresentando resistência cruzada ou co-resistência entre esses antimicrobianos e os desinfetantes. A resistência cruzada ocorre quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo, iniciando assim a morte celular através de uma via em comum e a co-resistência ocorre quando os genes de resistência ao biocida estão localizados junto com marcadores de resistência aos antibióticos no mesmo elemento genético móvel, como plasmídio, transposon ou integron. O resultado final para ambos os mecanismos é que o desenvolvimento de resistência para um agente antimicrobiano pode levar ao aparecimento de resistência para outro agente (CHAPMAN, 2003).

Miyazaki et al. (2007) verificaram que dos 74 isolados clínicos estudados, provenientes de três hospitais do Rio de Janeiro, 59 (80%) apresentavam o gene *qacA/B*. Os pesquisadores verificaram que o nível de 80% de *qacA/B* em cepas de MRSA isolados no Brasil era muito

maior do que os 45.9% encontrados no Japão por Noguchi et al. (2006). Este foi o primeiro relato da presença do gene *qacA/B* nas cepas de MRSA brasileiras, e em níveis tão altos.

#### **1.4 Resistência de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos em alimentos**

Micro-organismos isolados de alimentos têm demonstrado nas últimas décadas um considerável aumento de resistência para a maioria dos antibióticos (YÜCEL, ÇITAK e ÖNDER, 2005) inclusive a metilina (KITAE et al., 2005 apud PESAVENTO et al., 2007). Para alimentos, a questão da resistência a antimicrobianos pode ter dois enfoques maiores: os resíduos de antimicrobianos em alimentos com possível aparecimento de resistência bacteriana no trato gastro-intestinal humano e a aquisição de bactérias resistentes a partir de alimentos de origem animal (NETO e ALMEIDA, 2006).

A possibilidade de transmissão de infecções por *Staphylococcus* spp. pela ingestão de alimentos contaminados ainda não está totalmente elucidada, visto que este microrganismo é reconhecido classicamente pela produção de gastroenterite mediada por enterotoxinas estafilocócicas. A possibilidade de transmissão de MRSA através da alimentação era desconhecida até 1994, entretanto, segundo Pesavento (2007), quando *S. aureus* está presente na alimentação de um paciente imunocomprometido existe a possibilidade de chegar ao sistema circulatório e causar infecções, podendo gerar septicemia.

Em 1995 Kluytmans et al. relataram um surto provocado por MRSA em um hospital na Holanda, que teve início na unidade de hematologia do hospital e se disseminou para a unidade cirúrgica, com 21 pacientes desenvolvendo a doença clínica e cinco levados à óbito. O primeiro caso de óbito ocorreu em uma paciente imunossuprimida (neutropenia) que recebia alimentos preparados para pacientes neutropênicos no setor de hematologia. Esta desenvolveu septicemia por MRSA e faleceu dentro de três dias, apesar de ter recebido tratamento imediato com vancomicina. Nenhuma fonte ambiental ou de outros pacientes, dos funcionários do setor de hematologia e de outros contatos neste setor se mostrou positiva para MRSA. Após 10 dias de que a primeira paciente foi identificada, outros pacientes que carregavam MRSA foram identificados na unidade cirúrgica, que era localizada longe do setor de hematologia. Uma enfermeira da unidade cirúrgica estava colonizada por uma cepa de MRSA. Esta enfermeira provavelmente transmitiu este surto para a unidade de hematologia, pois ela foi transferida da unidade de hematologia logo após o primeiro caso ter sido identificado. Vinte e duas semanas após o início do surto, a análise bacteriana de rotina dos alimentos preparados para pacientes neutropênicos na unidade de hematologia revelou MRSA em um pedaço de banana, que havia sido preparado por um funcionário de preparo de

alimentos. Este funcionário estava trabalhando no preparo de alimentos na época do primeiro caso, mas nunca entrou em contato direto com os pacientes. A cepa de MRSA cultivada da paciente do setor de hematologia, do pedaço de banana e do funcionário demonstrou ser a mesma nas análises laboratoriais.

Outro caso com o envolvimento de MRSA foi relatado em 2001, quando uma família foi envolvida em um surto de toxinfecção alimentar devido à ingestão de MRSA em carne de porco contaminada por um manipulador de alimentos portador de MRSA (JONES et al., 2002; PESAVENTO et al., 2007).

O leite de vaca é uma fonte significativa de cepas de MRSA (LEE, 2003; KWON et al., 2005 apud MCKAY, 2008), além de poder também ser contaminado por SCN, principalmente de infecções resultantes de mastite, originado a partir de contato humano durante a ordenha (THORBERG et al., 2006 apud MCKAY, 2008). Assim, a venda e o consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados podem expor os consumidores não somente aos MRSA como também as espécies de SCN, que podem vir a carrear múltiplas resistências a agentes antimicrobianos, incluindo o gene *mecA* (MCKAY, 2008). Os alimentos podem estar desempenhando um papel importante na disseminação deste tipo de resistência (SIDHU, 2001).

McKay (2008) utilizando 70 amostras de leite não pasteurizado isolou oito cepas de *Staphylococcus* spp. carreando o gene *mecA* a partir de crescimentos bacterianos em meios de cultura enriquecidos com oxacilina, pois os estafilococos resistentes a esse antimicrobiano são resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos atualmente disponíveis. Além disso, dois isolados de *S. epidermidis* também apresentaram o gene *qacA/B*, que está relacionado a resistência aos biocidas à base de quaternário de amônio.

### **1.5 Resistência de *Staphylococcus* spp. aos biocidas em alimentos**

Estudos recentes têm indicado que a utilização de certos desinfetantes impôs uma pressão seletiva e contribuiu para o surgimento de micro-organismos resistentes a desinfetantes em ambientes de produção de alimentos (BAQUERO et al., 1998; RUSSELL, 2000). Se as bactérias resistentes a desinfetantes sobreviverem a desinfecções podem causar problemas de deterioração nos alimentos e afetar o processamento alimentar (como por exemplo causando fermentações). Patógenos resistentes, ao contaminar os alimentos, representam uma ameaça para a indústria alimentar e para os consumidores. A combinação de resistência aos desinfetantes com outros tipos de agentes antimicrobianos pode também tornar-se um desafio para as indústrias de alimentos no futuro. A resistência cruzada entre desinfetantes e

antibióticos nos patógenos alimentares poderá levar a consequências graves para a saúde pública (LANGSRUD et al., 2003).

As indústrias alimentícias frequentemente usam desinfetantes à base de QAC para erradicar e prevenir a propagação de micro-organismos indesejáveis (MCDONNEL e RUSSEL, 1999). Os determinantes de resistência aos QAC já foram descritos em SCN, os quais são menos valorizados do que *S. aureus* como patógenos humanos, mas fornecem um potencial reservatório para a transferência de genes de resistência antimicrobiana para *S. aureus*. Segundo MCKAY (2008) os antibióticos e desinfetantes utilizados nos hospitais e na pecuária de corte ou de produção de leite selecionam cepas resistentes de estafilococos, levando a um acúmulo potencial de resistência antimicrobiana.

Sidhu et al, em 2001, investigaram os genes de resistência aos quaternários de amônio em estafilococos coagulase negativa isolados de alimentos e de indústrias de processamento de alimentos. Os resultados desse estudo revelaram que alguns estafilococos carregavam tanto determinantes para resistência a desinfetantes (QAC) quanto de resistência aos antibióticos (penicilina) no mesmo plasmídeo, associados a elementos genéticos móveis, enquanto que outros estafilococos carregavam determinantes de resistência em plasmídeos separados. A resistência a  $\beta$ -lactâmicos foi a mais prevalente, porém alguns estafilococos se apresentaram carregando plasmídeos de resistência também a outros antibióticos.

## **1.6 Critérios microbiológicos para alimentos**

Uma das formas de promover a saúde pública é o estabelecimento de critérios microbiológicos, fornecendo alimentos que sejam seguros, saudáveis e satisfaçam os requerimentos das justas práticas de comércio. Segundo o *Codex Alimentarius*, um critério microbiológico para alimentos define a aceitabilidade de um produto ou lote de alimentos, com base na ausência ou presença do número de micro-organismos, incluindo parasitas, e/ou quantidade de suas toxinas ou metabólitos por unidade(s) de massa, volume, área ou lote (FORSYTHE, 2002).

O padrão microbiológico é um critério obrigatório, pois faz parte de uma lei ou de uma regulamentação administrativa. O não atendimento ao padrão microbiológico vigente constitui violação da lei, e medidas legais por parte dos órgãos competentes são possíveis (FRANCO, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o “regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos” no Brasil e estipula a enumeração de estafilococos coagulase positiva e, quando necessário podem ser determinadas a capacidade de produção de termonuclease e de

toxina estafilocócica das cepas isoladas a fim de se obter dados de interesse à saúde pública (BRASIL, 2001).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n°12 (BRASIL, 2001), os queijos de muita alta umidade, em torno de 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, Minas Frescal e outros, elaborados por coagulação enzimática e ação de bactérias lácticas, devem apresentar as seguintes tolerâncias para amostras indicativas:  $5 \times 10^2$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes a  $45^\circ\text{C/g}$ ,  $5 \times 10^2$  UFC de estafilococos coagulase positiva/g e ainda ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25g.

Métodos baseados em PCR para determinar a ocorrência de micro-organismos patogênicos e toxigênicos em alimentos são amplamente reconhecidos como capazes de diminuir o tempo de detecção e aumentar a especificidade e sensibilidade dos resultados (ERCOLINI *et al.*, 2004). Devido às informações sobre a sequência de DNA das SEs (MCLAUCHLIN *et al.*, 2000; REN *et al.*, 1994; SU; WONG, 1995, 1997), a PCR torna-se um método para a detecção dos genes destas toxinas (BECKER; ROTH; PETERS, 1998), mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos (FREITAS *et al.*, 2004 apud LUZ, 2008).

Freitas, em 2005, pesquisou a presença de estafilococos coagulase-positiva e coagulase negativa isolados de queijo Minas Frescal de algumas regiões do Rio de Janeiro e padronizou um protocolo de multiplex PCR baseado no trabalho de Mehrotra, Wang e Johnson (2000) para a detecção de genes de *S. aureus* que codificam para as suas enterotoxinas e o gene *femA*. Das 30 amostras de queijo Minas Frescal analisadas neste trabalho, 12 (40%) apresentaram contagens de estafilococos coagulase-positiva acima de  $5 \times 10^2$  UFC/g, valor este estabelecido como limite permitido pela ANVISA para o queijo Minas Frescal. Dez por cento das amostras apresentaram valores acima de  $10^5$  UFC/g, o que é preocupante principalmente pelo fato destes valores estarem muito próximos dos requeridos para a produção de enterotoxinas ( $10^5$  UFC/g a  $10^9$  UFC/g) e para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Das 231 colônias isoladas foram selecionadas 104 colônias coagulase positivas e 7 coagulase negativas para o teste da multiplex PCR. Trinta e quatro colônias (30,62%) foram positivas para algum dos cinco genes de enterotoxinas pesquisados. Os resultados deste trabalho revelam que alguns dos queijos Minas Frescal obtidos e comercializados na área geográfica deste estudo estão em desacordo com a Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001 quanto a quantificação de estafilococos coagulase positiva. Com relação à detecção do gene *femA*, 57 (51%) das 111 colônias analisadas amplificaram este gene.

Os critérios devem ser revisados periodicamente em busca de patógenos emergentes, troca

de tecnologia, e novas descobertas científicas (FORSYTHE, 2002). A legislação vigente no Brasil para padrões microbiológicos de alimentos deve ser atualizada periodicamente para uma maior abrangência dos riscos que os consumidores de alimentos possam estar sendo submetidos, principalmente os imunossuprimidos, pacientes hospitalizados, crianças, gestantes e idosos, que possuem uma maior vulnerabilidade dentre o conjunto de consumidores de alimentos submetidos a esta legislação.

### **1.7 Vigilância Sanitária como instrumento de proteção da população**

As origens da vigilância sanitária remontam à preocupação, das organizações sociais, com o nocivo, noção social e historicamente definida como fundamento para imposição de medidas de controle (COSTA, 1998). De acordo com o artigo 196-a da Constituição da República Federativa do Brasil a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1988).

A saúde tem como fatores determinantes e condicionantes, entre outros, a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais; os níveis de saúde da população expressam a organização econômica e social do país (BRASIL, 1990). O conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo poder público, constitui o Sistema Único de Saúde (SUS), no qual estão incluídas ações de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1990).

Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesses da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas do processo, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

O laboratório integra a estrutura da Vigilância Sanitária e constitui um instrumento imprescindível para a execução de suas ações especialmente no controle de produtos, e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, que é o laboratório tecnicamente ligado à Anvisa (Lei nº 9782, de 26/01/99), tem como missão “contribuir para a



promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”.

Entendendo a importância do fator alimentação como determinante e condicionante da saúde, este estudo pretende trazer dados a respeito da presença de genes de resistência a antimicrobianos e biocidas presentes em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal e sua suscetibilidade aos antimicrobianos, atentando para a possibilidade de um possível risco para consumidores, o que caracteriza um objeto de interesse para os laboratórios de Vigilância Sanitária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Traçar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a biocidas de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de queijo Minas Frescal.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (mupirocina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina, sulfazotrim, norfloxacina, cefotaxima, piperacilina+tazobactam, meropenem, penicilina G, cefepima, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, oxacilina e ceftioxina) dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos por FREITAS (2005) de queijo Minas Frescal através do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos estabelecido pela norma técnica M2-A9 do Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI, 2008);
- Verificar a presença dos genes *mecA* (gene de resistência à meticilina) e *qacA/B* (gene de resistência à biocidas a base de quaternário de amônio) através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) nos isolados supracitados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Verificação da viabilidade e pureza dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Foi verificada a pureza e viabilidade de 111 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos no estudo realizado anteriormente por Freitas (2005). Neste estudo foram analisadas trinta amostras de queijo Minas Frescal (10 amostras de queijos comercializados em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade, 10 de embalagens plásticas tipo queijeira e 10 em potes plásticos hermeticamente fechados, sendo que os 20 primeiros foram obtidos pelo processo de acidificação direta pela adição de ácido lático e os 10 últimos pelo processo de ultrafiltração), de três marcas comerciais coletadas em três supermercados do Estado do Rio de Janeiro.

Os isolados haviam sido testados em relação a sua pureza por Freitas (2005) e mantidos criopreservados em freezer -20°C. No presente estudo, foi preparada uma cultura estoque em ágar nutriente inclinado a partir dos criotubos estocados por Freitas (2005), armazenada em geladeira por período máximo de um mês. Cerca de 100 µL de cada cultura estoque foram semeados em 5 mL de caldo tripticaseína de soja (TSB), incubados a 37°C por 18-24 h, sob agitação a 200 rpm e posteriormente semeados sobre placas de Petri contendo agar tripticaseína de soja (TSA) para verificar a pureza da cultura. As características morfo-tintoriais foram confirmadas através da coloração de Gram e foi realizada a prova da catalase e da produção de coagulase, que foram conduzidas de acordo com a American Public Health Association (LANCETTE e BENNETT, 2001), Food and Drug Administration (BENNETT e LANCETTE, 1998) e o POP INCQS 65.3210032 (MANUAL DA QUALIDADE, 2007).

##### 3.1.1 Produção da enzima catalase

Uma alçada de crescimento em TSB foi transferida para a superfície de uma lâmina de vidro. Foi adicionada 100µL de peróxido de hidrogênio a 3% sobre o crescimento. Observou-se o desprendimento de oxigênio através da formação de bolhas, o que indicou o resultado positivo para representantes do gênero *Staphylococcus*. Uma cepa *S.aureus* ATCC 12600 foi utilizada como controle positivo e uma cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 como controle negativo do teste.

##### 3.1.2 Produção da enzima coagulase

Neste teste a primeira etapa realizada foi a transferência de 0,3 mL de uma cultura em caldo TSB para tubo de ensaio vazio e estéril. Foi adicionado 0,5 mL de plasma de coelho

com EDTA ao tubo e este foi homogeneizado vigorosamente. Incubou-se a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  e observou-se em um período de até 6 horas a formação de um coágulo de intensidade variando de 1+ até 4+ (caracterizando *Staphylococcus* spp. coagulase positiva) ou a não formação de coágulo (caracterizando *Staphylococcus* spp. coagulase negativa). Utilizou-se uma cepa de *S. aureus* ATCC 12600 como controle positivo e a de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como controle negativo.

### **3.2 Preparação do estoque das amostras bacterianas**

Após a verificação da pureza, alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  das culturas foram transferidas para criotubos estéreis, adicionadas de 400  $\mu\text{L}$  de solução de glicerol a 50% e estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Culturas de trabalho foram mantidas em ágar nutriente e estocadas em geladeira pelo prazo máximo de um mês até a sua utilização nos próximos experimentos.

### **3.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com o método estabelecido pela norma técnica M2-A9 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) para *Staphylococcus* spp., utilizando os seguintes antimicrobianos no teste: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER-meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina.

Uma alçada do crescimento de cada isolado de estafilococos obtidos a partir de queijo Minas Frescal foi inoculada em 3mL de caldo TSB e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ / 24 horas. No dia seguinte, este crescimento foi ajustado com TSB para corresponder a 0,5 da escala McFarland. Esse crescimento foi semeado em placas de agar Mueller-Hinton com o auxílio de um swab, em seguida foram colocados os discos dos antimicrobianos listados acima e incubados a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação de 16 a 18 horas para todos os antimicrobianos testados, com exceção de oxacilina e vancomicina, que necessitam de 24 horas de incubação para serem reportados como suscetíveis, foi procedida a leitura do diâmetro dos halos de inibição e classificação dos isolados dentro de uma das três categorias: sensível, intermediariamente resistente ou resistente ao antimicrobiano testado. A interpretação dos resultados de todos os antimicrobianos ocorreu de acordo com a tabela 2C da norma técnica M100-S18 do CLSI (CLSI, 2008), com exceção da interpretação em relação ao antimicrobiano mupirocina, que não está constando neste manual, sendo então adotada a

interpretação proposta por Creagh e Lucey (2007). A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como microrganismo controle no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

### 3.4 Extração de DNA

Para este procedimento foram semeados 10 µL de cada isolado em estudo em 5 mL de TSB e incubados a 37°C/18-24 horas sob agitação a 200 rpm. Do tubo de TSB com crescimento bacteriano foi transferida uma alíquota de 1000 µL para um microtubo de 2 mL e este foi centrifugado. O sedimento das células bacterianas foi suspenso em um tampão de lise para o Kit Qiagen (Qiagen, Inc, Valencia, CA) adicionado de 0,2 mg/mL de lisostafina e 10 mg/mL de lisozima e incubado a 37°C por 30 minutos. O DNA foi então extraído através da utilização do Kit Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA) de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.5 Pesquisa dos genes *mecA* e *qacA/B* através da reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR foi realizada utilizando iniciadores (*primers*) específicos para amplificar os genes *mecA* e *qacA/B*, conforme descrito na Tabela 1, utilizando o aparelho DNA Engine- Peltier Thermal Cycler (MJ Research- Massachussets-EUA).

Para a pesquisa do gene *mecA* foi preparada uma mistura de reação com 25 µL de volume final, contendo 3µL de DNA genômico purificado, 0,5 pmol/µL de primers *mecA*, 0,2 mM de solução de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 0,02 U de Taq DNA polimerase e 2,5 µl de tampão de reação 10X do kit da Platinum® Taq DNA Polimerase contendo 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação do gene *mecA* foi realizada de acordo com o programa realizado por Mehrotra et al. (2000): uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 min, anelamento a 57°C por 2 min e extensão a 72°C por 1 minuto), terminando com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33591 foram os micro-organismos utilizados na detecção do gene *mecA* como controles negativo e positivo, respectivamente.

Para o gene *qacA/B* foi preparada uma mistura de reação com 25 µL de volume final contendo 3µL de DNA genômico purificado, 1 pmol/µL do par de primers *qacA/B*, 0,2 mM de dNTP, 0,05U de Taq DNA polimerase e 2,5 µL de tampão de reação 10X do kit da Platinum® Taq DNA Polimerase contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação do gene *qacA/B* foi realizada de acordo com o programa realizado por Miyazaki et al. (2006) com algumas modificações, ficando estipulado da seguinte forma: uma desnaturação inicial de

95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min), terminando com uma extensão final a 72°C por 10 min. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 05/02 RJ-A (GenBank EF 418548) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram utilizadas respectivamente como controles positivo e negativo para o gene *qacA/B*.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X a 90V por 1,5 horas, adicionado de 3 µL de brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta.

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos (primers) a serem utilizadas nas amplificações dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* isolados de queijo Minas Frescal

Gene	Primer	Sequências dos oligonucleotídeos	Localização no gene	Amplicon Tamanho (pb)	Referências
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -R	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	1182-1201	163	Mehrotra <i>et al.</i> 2000
	<i>mecA</i> -F	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	1325-1344		
<i>qacA/B</i>	<i>qacA/B</i> -R	CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	1801-1824	417	Mayer <i>et al</i> 2001
	<i>qacA/B</i> -F	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG	2193-2217		

\*pb = pares de bases. R = primer de orientação reverse. F = primer de orientação forward.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Verificação da viabilidade e pureza de *Staphylococcus* spp.

Dos 111 isolados obtidos a partir do estudo realizado por Freitas (2005) foram utilizados 95 cocos Gram-positivos produtores da enzima catalase. Através da prova da coagulase foi verificado que 89 isolados se mostraram como coagulase positiva e 6 isolados como coagulase negativa (marcados com \* nos quadros 2, 5, 7, 8, 11, 12 e 13). Os 16 isolados não utilizados neste estudo foram descartados por se apresentarem contaminados por outros micro-organismos.

Freitas (2005) codificou os isolados obtidos de queijo minas frescal da seguinte maneira: a amostra de queijo (A) vinha seguida de uma numeração que caracterizou a ordem cronológica de sua análise, seguido da unidade formadora de colônia (C) e numeração da mesma quando foi obtida em placa de ágar Baird-Parker, da seguinte forma: o isolado A2C2 foi obtido da segunda amostra de queijo Minas Frescal analisada e foi a segunda unidade formadora de colônia selecionada em placa de ágar Baird-Parker. Esta codificação foi mantida nesse estudo.

### 4.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade de cada um dos 95 isolados encontram-se nos quadros 2, 3, 4, 5, 6 e 7 no caso de bactérias sem fenótipo de resistência à meticilina e no quadro 8 para bactérias com fenótipo de resistência à meticilina. Através do quadro 10 pode ser verificado que 15 (15,8%) isolados apresentaram-se como resistentes à cefoxitina, sendo 14 (14,7%) destes como resistentes também à oxacilina e um apresentou resistência intermediária à oxacilina (A25C7). Foram obtidos isolados com fenótipo de resistência à meticilina apenas das amostras de queijo denominadas A11 e A25.

No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos nem todos os isolados resistentes à meticilina se mostraram resistentes aos outros agentes  $\beta$ -lactâmicos testados, o que foi evidenciado pela sensibilidade de alguns destes isolados aos antibióticos ampicilina (A11C7, A11C12, A25C6) e cefepima (A11C10, A11C12, A25C7), 14 isolados sensíveis e um único resistente à piperacilina + tazobactam (A11C6), 11 isolados sensíveis e 4 apresentaram resistência ou resistência intermediária à meropenem (A11C13, A25C4, A25C6 e A25C8). Todos os isolados classificados como resistentes à meticilina se mostraram como resistentes também à penicilina G. Segundo o manual do CLSI M100-S18 (2008), no caso de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina/ cefoxitina e estafilococos coagulase negativas

(SCN), outros agentes  $\beta$ -lactâmicos podem aparecer ativos in vitro, mas são clinicamente ineficazes, portanto os resultados para essas drogas devem ser relatados como resistentes, ou não devem ser relatados. Apesar disto, optou-se neste estudo por relatar estes dados por se tratar de uma pesquisa científica.

Dentre os isolados analisados, apenas 14 (14,7%) se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos e 81 (85,3%) dos isolados intermediariamente resistentes ou resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e dentre os isolados não multirresistentes, 39 (41,0%) eram intermediariamente resistentes ou resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Foram encontrados 27 (28,4%) isolados multiresistentes com fenótipo de suscetibilidade à meticilina e 15 (15,8%) eram multiresistentes com fenótipo de resistência à meticilina (Quadro 9). A definição de multiresistência adotada neste estudo está relacionada com a resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos diferentes de acordo com a definição adotada por Rabatsky-Her et al., (2004), Gibbs et al., (2006) e Albuquerque et al., (2007).

O perfil global de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 95 isolados pode ser observado no quadro 10 e na figura 1, sendo que os antimicrobianos aos quais os isolados mostraram os maiores níveis de resistência foram a ampicilina com 54 cepas (56,8%) e penicilina G com 51 cepas (53,7%). Observou-se também que 20 (20,1%) isolados apresentaram-se resistentes à mupirocina.

#### **4.3- Pesquisa dos genes *mecA*, *qacA/B* através da reação em cadeia da polimerase e sua relação com o gene *femA* pesquisado por Freitas (2005).**

A amplificação dos genes *mecA* e *qacA/B* através de reação em cadeia da polimerase de alguns isolados está ilustrada nas figuras 2 e 3, respectivamente.

A pesquisa dos genes *mecA* e *qacA/B* comparada com os dados da presença do gene *femA*, sendo este último gene pesquisado e os seus dados gerados por Freitas (2005), e fenótipo de resistência para meticilina se encontram nos quadros 11, 12 e 13 para os 95 isolados de *Staphylococcus* spp. testados.

Segundo o manual do CLSI (2008), o teste para detecção do gene *mecA* é o método mais acurado para prever a resistência à oxacilina e neste estudo o gene *mecA* foi detectado em 21 (22,1%) dos 95 isolados pesquisados, sendo que dentre estes, 9 (42,8%) apresentaram-se com fenótipo de resistência correspondente ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (incluindo dois isolados SCN) e 12 (57,1%) se apresentaram suscetíveis à meticilina. Dentre os isolados, 74 (77,9%) não apresentaram o gene *mecA*, sendo que 68 (91,9%) não apresentaram fenótipo de resistência, incluindo 4 SCN e 6 (8,1%) apresentaram resistência à meticilina no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (tabela 2).



Em relação ao gene *femA*, específico para *S. aureus*, 35 (36,8%) isolados dentre os 95 analisados apresentaram este gene. Dentre os isolados que não possuem o gene *mecA*, 32 (91,4%) apresentam o gene *femA*, sendo dois (5,7%) com fenótipo de resistência. Dos que possuem o gene *mecA*, apenas três (8,6%) possuíam o gene *femA* e destes, dois (5,7%), possuíam fenótipo de resistência à oxacilina/ cefoxitina (tabela 2).

Foi procedida também a PCR para pesquisa do gene *qacA/B* que demonstrou que nenhum dos isolados estudados possuíam este gene (tabela 2).

**Quadro 2:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A2.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A2C1	S	R	S	I	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
A2C2	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
A2C3*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
A2C4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A2C5	S	R	S	S	I	S	R	S	S	R	I	S	S	I	S	S	S
A2C6	S	R	S	I	R	I	R	S	S	R	R	S	I	R	S	S	S
A2C7	R	R	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A2C8	S	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
A2C9	R	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A2C10*	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A2C11	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A2C12	R	R	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A2C14	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A2C15	R	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 3:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A3.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A3C2	S	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A3C3	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A3C4	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
A3C5	R	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A3C7	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
A3C8	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
A3C9	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A3C10	S	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
A3C11	S	R	S	S	S	S	I	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A3C12	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A3C13	R	R	S	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S
A3C14	R	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A3C15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 4:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A5 e A11.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A5C1	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
A5C2	S	S	S	S	R	R	I	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A5C4	R	R	S	S	R	I	I	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
A5C5	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
A5C7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A5C8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A5C9	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A5C10	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
A5C11	R	R	S	I	S	R	S	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S
A5C12	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A5C15	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
A5C16	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A11C3	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A11C8	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 5:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A21e A22.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A21C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A21C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A21C3	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A21C4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A21C6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A21C7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A22C2*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A22C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A22C4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A22C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 6:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos da amostra de código A27.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A27C1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A27C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	I	S	S	S
A27C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A27C4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A27C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
A27C6	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A27C8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A27C9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A27C10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A27C11	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A27C12	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
A27C13	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A27C14	R	R	S	S	S	S	I	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A27C15	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 7:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. sem fenótipo de resistência à meticilina obtidos das amostras de códigos A28 e A30.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A28C1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A28C2	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S
A28C5	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A28C6	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A28C7	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
A28C8	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
A30C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
A30C2	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A30C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A30C4	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A30C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A30C6	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S
A30C7	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S
A30C8	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S
A30C9*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.

**Quadro 8:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados *Staphylococcus* spp. com fenótipo de resistência à meticilina obtidos das a mostras de códigos A11 e A25.

Cepas	Antimicrobianos																
	MUP	AMP	TET	CLI	SUT	NOR	CTX	PPT	MER	PEN	CPM	CLO	GEN	ERI	OXA	CFO	VAN
A11C1	S	R	S	I	S	S	R	S	S	R	R	S	I	I	R	R	S
A11C4*	S	R	S	I	S	S	R	S	S	R	R	S	S	I	R	R	S
A11C5	S	R	S	R	R	I	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S
A11C6	S	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S	R	I	R	R	S
A11C7	S	S	S	R	S	I	R	S	S	R	R	S	R	I	R	R	S
A11C9	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	I	R	R	S
A11C10	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	I	R	R	S
A11C12	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	I	R	R	S
A11C13	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	I	I	I	R	R	S
A25C1*	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	I	I	R	R	S
A25C4	S	R	S	R	S	S	R	S	I	R	R	S	R	I	R	R	S
A25C5	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	I	R	R	S
A25C6	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	R	S	S	I	R	R	S
A25C7	R	R	S	R	S	S	I	S	S	R	S	S	R	I	I	R	S
A25C8	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S

Abreviações para antimicrobianos: MUP-mupirocina, AMP-ampicilina, TET-tetraciclina, CLI-clindamicina, SUT-sulfametoxazol-trimetoprim, NOR-norfloxacina, CTX-cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina-G, CPM- cefepima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, ERI-eritromicina, OXA-oxacilina, CFO-cefoxitina e VAN-vancomicina. Abreviações para suscetibilidade: S- isolados sensíveis, I- isolados com resistência intermediária, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado. Os isolados marcados com \* são coagulase negativas.



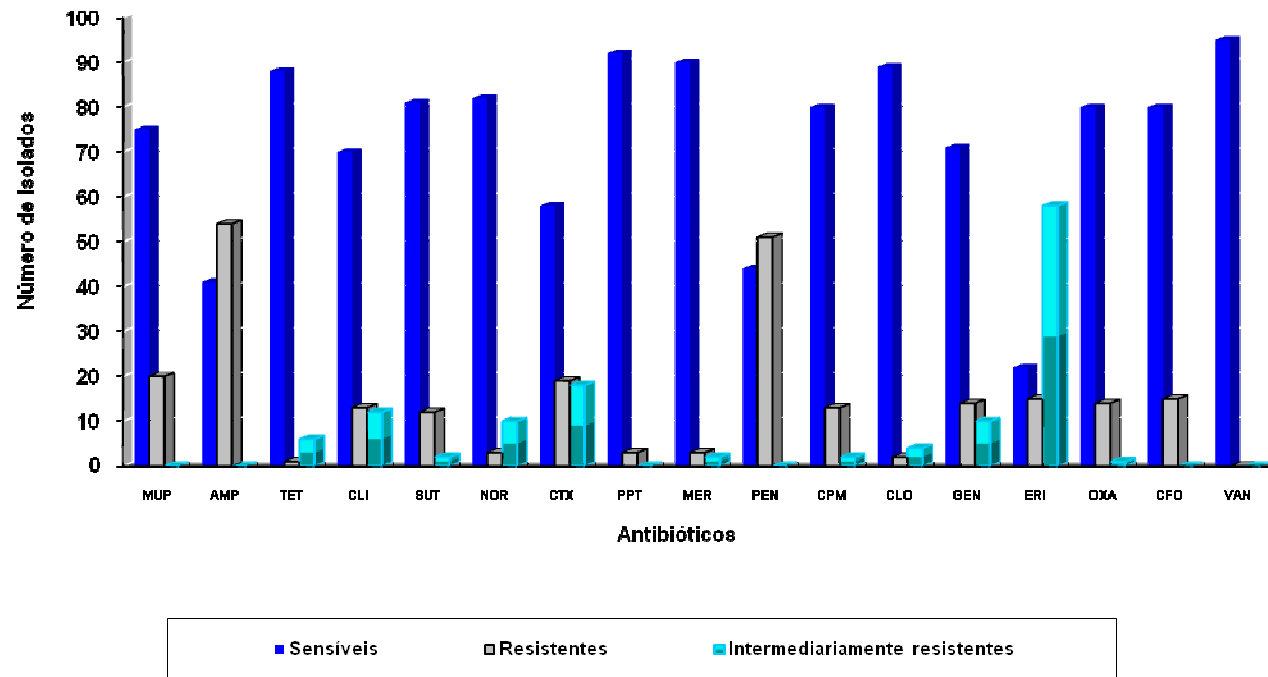
**Quadro 9:** Nível de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de queijo Minas Frescal

<b>Tipos de cepas</b>	<b>Número de cepas</b>
Sensíveis a todos os antimicrobianos testados	14 (14,7%)
Intermediariamente resistentes ou resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado	81 (85,3%)
Resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos com fenótipo de suscetibilidade à meticilina (multiresistentes)	27 (28,4%)
Resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos com fenótipo de resistência à meticilina (multiresistentes)	15(15,8%)
Intermediariamente ou resistentes a pelo menos um antimicrobiano e não multiresistentes	39(41,0%)
Total de isolados testados	95 (100%)

A definição de multiresistência adotada neste estudo está relacionada a resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos diferentes de acordo com a definição de Rabatsky-Her et al., (2004), Gibbs et al., (2006) e Albuquerque et al., (2007).

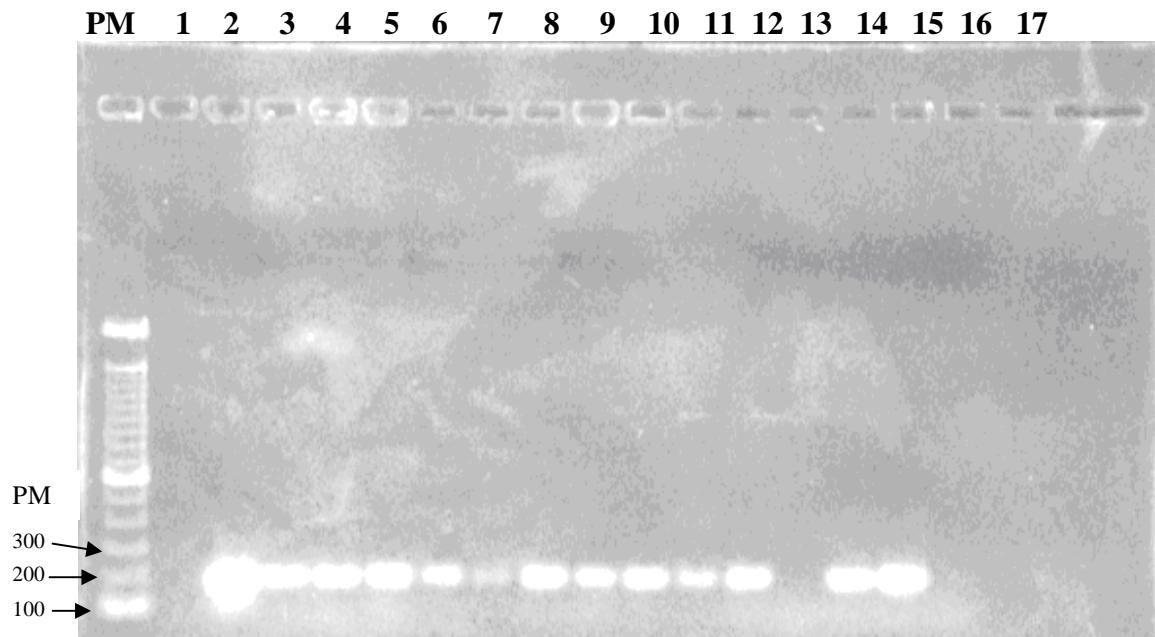
**Quadro 10:** Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de queijos Minas Frescal

<b>Antimicrobianos testados</b>	<b>Isolados sensíveis</b>	<b>Isolados resistentes</b>	<b>Isolados intermediariamente resistentes</b>	<b>Total de isolados estudados</b>
Mupirocina	75(78,9%)	20(21,1%)	0	95 (100%)
Ampicilina	41(43,1%)	54(56,8%)	0	
Tetraciclina	88(92,6%)	1(1,0%)	6(6,3%)	
Clindamicina	70(73,7%)	13(13,7%)	12(12,6%)	
Sulfametoxazol-trimetoprim	81(85,3%)	12(12,6%)	2(2,1%)	
Norfloxacina	82(86,3%)	3(3,1%)	10(10,5%)	
Cefotaxima	58(61,0%)	19(20,0%)	18(18,9%)	
Piperacilina+tazobactam	92(96,8%)	3(3,1%)	0	
Meropenem	90(94,7%)	3(3,1%)	2(2,1%)	
Penicilina G	44(46,3%)	51(53,7%)	0	
Cefepima	80(84,2%)	13(13,7%)	2(2,1%)	
Cloranfenicol	89(93,7%)	2(2,1%)	4 (4,2%)	
Gentamicina	71(74,7%)	14(14,7%)	10(10,5%)	
Eritromicina	22(23,1%)	15(15,8%)	58(61,0%)	
<b>Oxacilina</b>	<b>80(84,2%)</b>	<b>14(14,7%)</b>	<b>1(1,0%)</b>	
<b>Cefoxitina</b>	<b>80(84,2%)</b>	<b>15(15,8%)</b>	<b>0</b>	
Vancomicina	95(100%)	0	0	



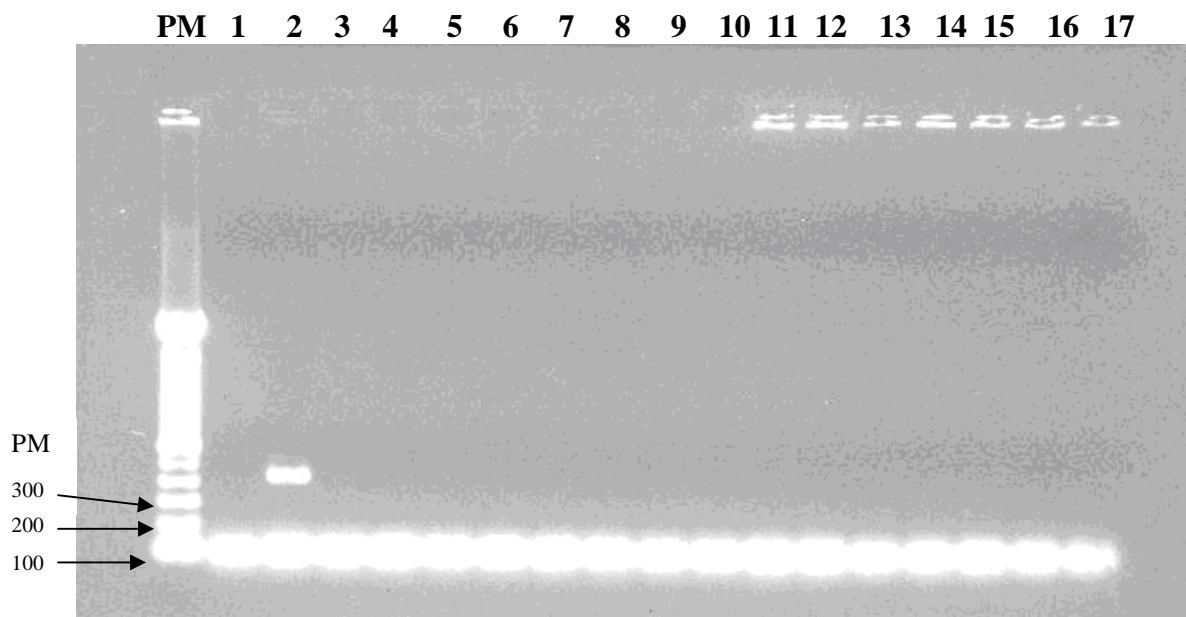
MUP- mupirocina, AMP- ampicilina, TET- tetraciclina, CLI- clindamicina, SUT- sulfametoxazol-trimetoprim, NOR- norfloxacina, CTX- cefotaxima, PPT- piperacilina+tazobactam, MER- meropenem, PEN- penicilina G, CPM- cefepima, CLO- cloranfenicol, GEN- gentamicina, ERI- eritromicina, OXA- oxacilina, CFO- cefoxitina, VAN- vancomicina.

**Figura 1:** Perfil global de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de queijo Minas Frescal relacionando número de isolados com antibióticos testados.



PM (pb)- peso molecular (pares de base); pista 1- *S.aureus* ATCC 25923 (controle negativo), pista 2- *S.aureus* ATCC 33591 (controle positivo). Pistas 3 a 12 e 14 a 15: *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos. Pista 3- isolado A5C9, pista 4- A5C12, pista 5- A5C15, pista 6- A5C16, pista 7- A11C1, pista 8- A11C2, pista 9- A11C3, pista 10- A11C4, pista 11- A11C6, pista 12- A11C7, pista 13- A11C8, pista 14- A11C9, pista 15- A11C11, pista 16- A11C12, pista 17- A11C13

**Figura 2:** Produto da amplificação do gene *mecA* obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR)



PM (pb)- peso molecular (pares de base); pista 1- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (controle negativo), pista 2- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 05/02 RJ-A- (controle positivo). Pistas 3 a 17- isolados negativos para o gene *qacA/B*. Pista 3- isolado A22C1, pista 4- A22C2, pista 5- A22C3, pista 6- A25C1, pista 7- A25C4, pista 8- A25C5, pista 9- A25C7, pista 10- A25C8, pista 11- A27C1, pista 12- A27C2, pista 13- A27C3, pista 14- A27C4, pista 15- A27C5, pista 16- A27C6, pista 17- A27C8

**Figura 3:** Produto da amplificação do gene *qacA/B* obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

**Quadro 11:** Presença dos genes *mecA*, *qacA/B*, *femA* e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A2, A3 e A5

Isolados	<i>qacA/B</i>	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Fenótipo em relação a oxacilina/cefoxitina e multiresistência
A2C1	-	-	sim	sensível- MR
A2C2	-	-	sim	sensível- MR
A2C3*	-	-	-	sensível
A2C4	-	-	-	sensível
A2C5	-	-	-	sensível- MR
A2C6	-	-	sim	sensível- MR
A2C7	-	-	sim	sensível- MR
A2C8	-	-	sim	sensível- MR
A2C9	-	-	-	sensível- MR
A2C10*	-	-	-	sensível
A2C11	-	-	-	sensível
A2C12	-	-	sim	sensível- MR
A2C14	-	-	sim	sensível
A2C15	-	-	-	sensível- MR
A3C2	-	-	-	sensível
A3C3	-	-	sim	sensível- MR
A3C4	-	-	sim	sensível- MR
A3C5	-	-	sim	sensível- MR
A3C7	-	-	sim	sensível
A3C8	-	-	-	sensível- MR
A3C9	-	-	-	sensível
A3C10	-	-	sim	sensível- MR
A3C11	-	-	sim	sensível- MR
A3C12	-	-	-	sensível- MR
A3C13	-	-	-	sensível- MR
A3C14	-	-	-	sensível- MR
A3C15	-	-	sim	sensível
A5C1	-	-	sim	sensível
A5C2	-	-	sim	sensível- MR
A5C4	-	-	sim	sensível- MR
A5C5	-	-	sim	sensível- MR
A5C7	-	-	sim	sensível
A5C8	-	-	sim	sensível
A5C9	-	sim	sim	sensível
A5C10	-	-	sim	sensível- MR
A5C11	-	-	sim	sensível- MR
A5C12	-	sim	sim	sensível
A5C15	-	sim	-	sensível- MR
A5C16	-	sim	-	sensível

A definição de multiresistência (MR) adotada neste estudo está relacionada a resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos diferentes de acordo com a definição de Rabatsky-Her et al. (2004), Gibbs et al. (2006) e Albuquerque et al. (2007). Os isolados marcados com \* são coagulase negativas. Os dados do gene *femA* foram obtidos no trabalho desenvolvido por Freitas (2005). Os isolados que não possuíam o gene apontado no quadro foram marcados com o símbolo – e os que possuíam o gene com a palavra “sim”.

**Quadro 12:** Presença dos genes *mecA*, *qacA/B*, *femA* e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A11, A21, A22 e A25

Isolados	<i>qacA/B</i>	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Fenótipo em relação a oxacilina/cefoxitina e multiresistência
A11C1	-	sim	-	resistente- MR
A11C3	-	sim	-	sensível
A11C4*	-	sim	-	resistente- MR
A11C5	-	sim	-	resistente- MR
A11C6	-	sim	-	resistente- MR
A11C7	-	sim	-	resistente- MR
A11C8	-	-	-	sensível
A11C9	-	sim	-	resistente- MR
A11C10	-	sim	-	resistente- MR
A11C12	-	-	-	resistente- MR
A11C13	-	-	-	resistente- MR
A21C1	-	-	-	sensível
A21C2	-	-	-	sensível
A21C3	-	-	-	sensível- MR
A21C4	-	-	-	sensível
A21C6	-	sim	-	sensível
A21C7	-	sim	-	sensível
A22C2*	-	-	sim	sensível
A22C3	-	-	sim	sensível
A22C4	-	-	sim	sensível
A22C5	-	-	-	sensível
A25C1*	-	sim	-	resistente- MR
A25C4	-	-	sim	resistente- MR
A25C5	-	sim	sim	resistente- MR
A25C6	-	-	-	resistente- MR
A25C7	-	-	-	resistente- MR
A25C8	-	-	sim	resistente- MR
A27C1	-	-	-	sensível
A27C2	-	-	-	sensível
A27C3	-	sim	-	sensível
A27C4	-	sim	-	sensível
A27C5	-	sim	-	sensível
A27C6	-	sim	-	sensível
A27C8	-	-	-	sensível
A27C9	-	sim	-	sensível
A27C10	-	-	-	sensível
A27C11	-	-	-	sensível
A27C12	-	-	-	sensível
A27C13	-	-	-	sensível
A27C14	-	-	-	sensível- MR
A27C15	-	-	-	sensível

A definição de multiresistência (MR) adotada neste estudo está relacionada a resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos diferentes de acordo com a definição de Rabatsky-Her et al. (2004), Gibbs et al. (2006) e Albuquerque et al. (2007). Os isolados marcados com \* são coagulase negativas. Os dados do gene *femA* foram obtidos no trabalho desenvolvido por Freitas (2005). Os isolados que não possuíam o gene apontado no quadro foram marcados com o símbolo – e os que possuíam o gene com a palavra “sim”.

**Quadro 13:** Presença dos genes *mecA*, *qacA/B*, *femA* e fenótipo de resistência a oxacilina/meticilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal de códigos A28 e A30

Isolados	<i>qacA/B</i>	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Fenótipo em relação à metilicina e multiresistência
A28C1	-	-	sim	sensível
A28C2	-	-	sim	sensível- MR
A28C5	-	-	-	sensível
A28C6	-	-	-	sensível
A28C7	-	-	-	sensível
A28C8	-	-	sim	sensível
A30C1	-	-	sim	sensível
A30C2	-	-	sim	sensível
A30C3	-	-	-	sensível
A30C4	-	-	-	sensível
A30C5	-	-	-	sensível
A30C6	-	-	-	sensível
A30C7	-	-	-	sensível
A30C8	-	-	-	sensível
A30C9*	-	-	-	sensível

A definição de multiresistência (MR) adotada neste estudo está relacionada a resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos diferentes de acordo com a definição de Rabatsky-Her et al. (2004), Gibbs et al. (2006) e Albuquerque et al. (2007). Os isolados marcados com \* são coagulase negativas. Os dados do gene *femA* foram obtidos no trabalho desenvolvido por Freitas (2005). Os isolados que não possuíam o gene apontado no quadro foram marcados com o símbolo – e os que possuíam o gene com a palavra “sim”.



**Tabela 2:** Presença dos genes *mecA*, *qacA/B* e *femA* e do fenótipo de resistência a oxacilina e cefoxitina nos isolados de *Staphylococcus* spp.

Número total de isolados analisados	Gene	Presença dos genes	Nº e % de isolados encontrados em relação aos genes pesquisados	Fenótipo em relação à oxacilina/ cefoxitina	
				Resistência	Suscetibilidade
95 (100%)	<i>qacA/B</i>	Com <i>qacA/B</i>	0	0	0
		Sem <i>qacA/B</i>	95 (100%)	15 (15,8%)	80 (84,2%)
	<i>mecA</i>	Com <i>mecA</i>	21 (22,1%)	9 (42,8%)	12 (57,1%)
		Sem <i>mecA</i>	74 (77,9%)	6 (8,1%)	68 (91,9%)
	<i>femA</i> (total com <i>femA</i> : 35 (36,8%) e total sem <i>femA</i> : 60 (63,1%))	Com <i>femA</i> Com <i>mecA</i>	3 (8,6%)	2 (5,7%)	1 (2,8%)
		Com <i>femA</i> Sem <i>mecA</i>	32 (91,4%)	2 (5,7%)	30 (85,7%)
		Sem <i>femA</i> Com <i>mecA</i>	18 (30%)	8 (13,3%)	10 (16,7%)
		Sem <i>femA</i> Sem <i>mecA</i>	42 (70%)	4 (6,7%)	38 (63,3%)

Os dados de *femA* foram obtidos na pesquisa realizada por Freitas (2005). As porcentagens dos grupos “com” ou “sem” os genes *qacA/B*, *mecA* e *femA* se referem ao total de 95 (100%) isolados e estão na coluna “nº e % de isolados encontrados em relação aos genes pesquisados”, com exceção dos dados correspondentes para *femA* que se encontram na coluna “gene”. As porcentagens das colunas que fazem parte de “fenótipo em relação a oxacilina/cefexotina” tomam como 100% o subgrupo a que se referem em “presença dos genes”, ou seja, o nº apresentado na coluna “nº e % de isolados encontrados em relação aos genes pesquisados”, com exceção dos que se referem ao gene *femA*. No caso do gene *femA* a coluna “fenótipo em relação a oxacilina/cefexotina” tomam como 100% o nº total com o gene *femA* (35) no caso dos subgrupos “com *femA* e com *mecA*” e “com *femA* e sem *mecA*” e como 100% o nº total sem o gene *femA* (60) no caso dos subgrupos “sem *femA* e com *mecA*” e “sem *femA* e sem *mecA*”.

## 5 DISCUSSÃO

Queijos frescos constituem um meio adequado para o crescimento de patógenos e muitos têm sido frequentemente associados a várias doenças transmitidas por alimentos em diversos países. Neste sentido, as características físico-químicas do queijo Minas Frescal aumentam o risco potencial da ocorrência de patógenos neste tipo de alimento (CARVALHO, VIOTTO e KUAYE, 2007). A contaminação de alimentos com *S. aureus* deve-se primariamente à sua presença na matéria-prima (DE BUYSER et al., 2001), apesar de um grande número de surtos de intoxicações alimentares envolverem cepas de origem humana como fontes de contaminação (VAUTOR et al., 2003). A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e sua presença em manipuladores assintomáticos está bem documentada na literatura (AL BUSTAN, UDO e CHUGH, 1996; SOTO et al., 1996; SOARES et al., 1997; SUZUKI, SAITO e ISHIKAWA, 1999; TONDO et al., 2000; FIGUEROA et al., 2002; ACCO et al., 2003; AYCIÇEK et al., 2004; HATAKKA et al., 2004). Neste estudo foram utilizados isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de queijos cuja matéria-prima passa por processamento térmico para eliminação de micro-organismos patogênicos o que sugere que a sua provável contaminação deve ter ocorrido ao longo da cadeia produtiva.

Foram utilizados 95 isolados obtidos por Freitas (2005), oriundos de 30 amostras de queijo Minas Frescal, sendo que a presença de *Staphylococcus* spp. foi observada apenas nas amostras de queijos comercializados em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade e de embalagens tipo queijeira, ou seja, os queijos obtidos pela acidificação direta pela adição de ácido láctico. Os queijos analisados por Freitas (2005) que foram obtidos pelo processo de ultrafiltração não apresentaram nenhum crescimento microbiano. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Carvalho, Viotto e Kuaye (2007), que avaliaram a influência de três diferentes métodos de fabricação de queijo Minas Frescal nas características físico-químicas e microbiológicas destes produtos. Neste último estudo citado, em relação à pesquisa de estafilococos coagulase positiva, foram obtidas contagens destes micro-organismos somente em queijos elaborados pelos processos de adição de culturas ácido-lácticas e por acidificação direta pela adição de ácido láctico industrial. Por outro lado, no caso do queijo obtido pelo processo de ultrafiltração, o resultado para presença destes micro-organismos foi negativo.

Estafilococos possuem uma notável capacidade de se tornarem resistentes a agentes antimicrobianos (WEESE e DUIJKEREN, 2010). A resistência bacteriana é uma resposta ao estresse antimicrobiano com base na seleção, o que enfraquece o efeito da quimioterapia (MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ et al., 2004). A evolução e a disseminação de micro-

organismos resistentes aos antimicrobianos são o resultado da pressão seletiva imposta 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 de fármacos como promotores de crescimento em animais de produção (TAVARES, 2000).

No presente estudo os resultados obtidos no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de queijos Minas Frescal demonstraram que 14 (14,7%) isolados se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 15 (15,8%) isolados apresentaram-se resistentes à cefoxitina e 14 (14,7%) resistentes à oxacilina, juntamente com um adicional possuindo resistência intermediária à oxacilina. Além disso, todos os isolados com suscetibilidade à oxacilina/cefotaxima eram resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos, portanto sendo considerados multiresistentes, incluindo dois isolados negativos na prova da coagulase. Os antibióticos com maiores porcentagens de resistência foram ampicilina com 54 (56,8%) e penicilina G com 51 (53,7%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que vêm documentando a presença de cepas de estafilococos resistentes aos antimicrobianos em diversos alimentos, inclusive produtos lácteos. Em um estudo realizado por Pereira et al. (2009) no qual vários alimentos foram analisados (incluindo carnes cruas, produtos cárneos fermentados tradicionais portugueses, queijos, leite cru proveniente de vacas com mastite, leite cru proveniente de vacas saudáveis e outros produtos alimentícios), na pesquisa de suscetibilidade aos antimicrobianos para isolados de *Staphylococcus aureus*, 15% se mostraram sensíveis a todos os antibióticos testados, sendo que a resistência a  $\beta$ -lactâmicos como ampicilina, penicilina e oxacilina foi evidente em 70, 73 e 38% respectivamente, sendo maior que o percentual encontrado nesse estudo.

No trabalho realizado por André et al. (2008) para caracterizar fenotipicamente 73 *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores de alimentos, leite cru e queijo Minas Frescal em um laticínio em Goiás, 9 (12,3%) isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados e todos os isolados foram susceptíveis à gentamicina, o que não ocorreu no presente estudo, no qual 14 (14,7%) dos isolados se mostraram resistentes e 10 (10,5%) se mostraram intermediariamente resistentes a este antibiótico. Os mesmos autores observaram resistência em 18 (24,7%) dos isolados para tetraciclina, 51 (69,9%) para penicilina, quatro (5,5%) para oxacilina e eritromicina. No caso específico de queijo Minas Frescal, foram obtidos 20 isolados, dos quais 12 (60,0%) apresentaram resistência à penicilina. Neste alimento a resistência à oxacilina foi obtida em apenas um isolado, sendo outros três obtidos de manipuladores de alimentos. Os autores consideraram que a disseminação de MRSA, ou

outros *S. aureus* multiresistentes por alimentos ou manipuladores de alimentos é uma situação preocupante e deve ser evitada na cadeia alimentar.

Pesavento et al. (2007) obtiveram 42 isolados de *Staphylococcus aureus* a partir de amostras de carne crua (aves, suínos e bovinos) e no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos verificaram que 13 (30.95%) isolados se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 28 (66.67%) resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados e muitos isolados multiresistentes, o que foi considerado por estes autores como a resistência a três ou mais antimicrobianos diferentes. Estes resultados reforçam a hipótese de que a resistência a antibióticos está presente não apenas em bactérias nosocomiais, mas também em micro-organismos na comunidade.

Foi observado também no presente estudo que 20 (20,1%) dos isolados analisados se mostraram resistentes ao antimicrobiano mupirocina, que é um antibiótico tópico com um alto nível de ação contra estafilococos e estreptococos (SUTHERLAND et al., 1985 apud UPTON, LANG e HEFFERNAN, 2003) e é usado no tratamento de infecções superficiais da pele e para controlar a propagação de cepas MRSA (UPTON, LANG e HEFFERNAN, 2003). Segundo UPTON, LANG e HEFFERNAN (2003) a resistência a mupirocina na Nova Zelândia é grande na comunidade onde este tipo de antibiótico é disponibilizado sem prescrição médica. No caso do presente estudo a resistência pode estar ocorrendo pelo uso por manipuladores de queijo Minas Frescal, o que estaria gerando bactérias com este tipo de característica fenotípica nos queijos.

Neste estudo, dentre os estafilococos que foram classificados como multiresistentes, 27 (28.4%) possuíam suscetibilidade à metilicina e 15 (15,8%) eram resistentes à metilicina. Intermediariamente resistentes ou resistentes a pelo menos um antimicrobiano e não multiresistentes totalizaram 39 (41,0%). Albuquerque et al. (2007) realizaram uma investigação a respeito da presença de *S. aureus* resistente aos antimicrobianos nas bancadas de venda de peixe, nas mãos, cavidades nasal e oral de manipuladores de pescado e obtiveram 27 isolados, sendo que 6 eram resistentes à oxacilina, dois provenientes dos manipuladores de alimentos e 4 provenientes de bancadas de venda de peixe. 15 (55.55%) eram não multiresistentes, com 14 resistentes apenas à ampicilina e um isolado resistente à ampicilina e à oxacilina. Um dos isolados multiresistentes de *S. aureus* era resistente a seis antibióticos de quatro classes distintas. Os isolados de *S. aureus* multiresistentes representaram 44% e dentre estes 18,5% possuíam fenótipo de resistência à oxacilina. De acordo com o exposto pode-se observar que estafilococos obtidos de diversos tipos de alimentos, de locais onde são manipulados para comercialização e dos próprios manipuladores dos mesmos, vem

demonstrando perfil de resistência para diversos antimicrobianos, inclusive para oxacilina/cefotaxima, o que caracteriza a resistência à meticilina.

No estudo aqui realizado dois isolados SCN mostraram possuir fenótipo de resistência à meticilina. Em um estudo realizado por Resch, Nagel e Hertel (2008) foi avaliada a resistência aos antimicrobianos de 330 SCN associados a alimentos, usados em culturas “starter” comerciais e de amostras clínicas de pacientes. As espécies estudadas foram *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus condimenti*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* e *Staphylococcus xylosus*, testadas contra 21 antimicrobianos pelo método de disco difusão. Do total de isolados a partir de queijos duros e moles (17 isolados de *Staphylococcus equorum*, 4 de *Staphylococcus succinus* e 10 de *Staphylococcus xylosus*) o fenótipo de resistência foi de 55% à penicilina, 32% à ampicilina, 42% à tetraciclina, 35% à oxacilina e 3% à cefotaxima. É possível observar que as espécies de SCN isoladas de queijos podem possuir resistência a antibióticos. Segundo Irlinger (2008) a alta prevalência de SCN e seu potencial patogênico (existência de enterotoxinas e cepas multirresistentes), não foram claramente identificados, mas isso é cada vez mais necessário para avaliar o estado de segurança dos SCN industriais em alimentos lácteos fermentados. Nenhum SCN isolados de leite ou produtos lácteos já foi envolvido em um caso de infecção humana após a ingestão de produtos lácteos contaminados. No entanto, alguns casos de infecção hospitalar causada por algumas espécies têm sido relatados em pacientes com sistema imunológico deprimido, que tenham sido submetidos a tratamentos hospitalares invasivos, uso de cateter ou próteses cardíacas por exemplo. Estes estafilococos podem ser considerados como oportunistas excepcionais em determinadas situações clínicas (IRLINGER, 2008).

Apesar dos dados obtidos através de testes como os de disco difusão dos manuais do CLSI, a expressão de resistência heterogênea à meticilina é uma limitação inerente dos métodos de detecção fenotípica de MRSA (MONSEN et al., 2003). A detecção do gene *mecA* através de técnicas moleculares como a PCR é considerada como padrão ouro na caracterização de MRSA (MIYAZAKI, 2006).

No presente estudo foi determinada a presença dos genes *mecA* e fenótipo de resistência à oxacilina/cefotaxima (ou seja, à meticilina) nos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos das amostras de queijo Minas Frescal e foi verificado que 74 (77,9%) deles não possuíam o gene *mecA*, com 68 (91,9%) destes, incluindo quatro isolados SCN, não possuindo fenótipo de resistência à meticilina e 6 (8,1%) possuindo fenótipo de resistência. Além disso, 21 (22,1%) dos isolados possuíam o gene *mecA*, sendo que 9 (42,8%) deles possuíam o fenótipo de resistência, incluindo dois isolados SCN, e 12 (57,1%) não possuíam fenótipo de resistência.

Pode-se observar que ocorreram quatro situações distintas na correlação genotípica e fenotípica: a de isolados que não possuem o gene *mecA* e não apresentaram fenótipo de resistência, os que possuem o gene *mecA* e apresentaram fenótipo de resistência, e duas situações não previstas, que foram os isolados que não possuem o gene *mecA* e possuem fenótipo de resistência e os isolados que possuem o gene *mecA* e não possuem fenótipo de resistência à meticilina.

Dados semelhantes em relação aos resultados não previstos de isolados que não possuíam o gene *mecA* mas apresentaram fenótipo de resistência para meticilina foram obtidos por Pereira et al. (2009), que relataram ter obtido em seus experimentos, utilizando o teste de suscetibilidade a antimicrobianos do CLSI, que 38% dos micro-organismos eram resistentes à oxacilina, porém os resultados obtidos por PCR pela pesquisa do gene *mecA* demonstraram que este gene foi determinado em apenas 0.68% dos isolados. Em um estudo realizado por Lee et al. (2003) foram coletadas amostras de fezes, leite, matérias-primas, das articulações, traquéias, úteros e carne bovina, suína e de frango. Um teste agar screen com oxacilina foi realizado para determinar o fenótipo de resistência à oxacilina em isolados de *S. aureus* e isolados SCN, além da pesquisa do gene *mecA* pela PCR. Vinte e oito isolados de origem animal foram resistentes à oxacilina. Destes, 15 foram *mecA* positivos e 13 foram *mecA* negativos pela PCR. De 35 cepas *S. aureus* meticilina susceptíveis, todas foram *mecA* negativas. De 156 isolados de SCN, nove continham o gene *mecA* e 147 não possuíam. Neste caso os nove isolados *mecA* positivos de SCN possuíam fenótipo de resistência e os 147 isolados *mecA* negativos foram negativos também em relação ao fenótipo de resistência.

Moon et al. (2007) realizaram uma pesquisa do fenótipo de resistência à meticilina e presença do gene *mecA* com *S. aureus* e SCN isolados a partir de amostras de leite provenientes de vacas com mastite. Estes autores verificaram que 21 (2.5%) *S. aureus* e 19 (2.4%) SCN foram fenotipicamente resistentes à meticilina (com concentração mínima inibitória de oxacilina  $\geq 4\mu\text{g/mL}$ ). O gene *mecA* também foi encontrado em 13 *S. aureus* resistentes à meticilina e 12 SCN resistentes à meticilina. Estes autores perceberam também que tanto os isolados de *S. aureus* quanto os isolados de SCN, resistentes à meticilina, se mostraram resistentes também a outros antimicrobianos (ampicilina, cefalotina, kanamicina e gentamicina). No presente estudo, todos os isolados que possuíam resistência à meticilina se mostraram também multiresistentes. No estudo realizado por Moon et al. (2007) pode-se observar que muitos isolados que não apresentaram o gene *mecA* eram fenotipicamente resistentes à meticilina.

A explicação para o fato de algumas bactérias não possuírem o gene *mecA* porém apresentarem o fenótipo de resistência para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ou possuírem este

gene e não apresentarem fenótipo de resistência, pode estar em um tipo de bactéria denominadas resistentes a meticilina borderline (ou com pequeno nível de resistência). Essas cepas são caracterizadas por possuírem concentração mínima inibitória para meticilina no valor limite ou pouco acima do valor da suscetibilidade. As cepas borderline podem ser divididas em duas categorias: cepas borderline que contém o gene *mecA* e são extremamente heterogêneas na produção de PLP 2a (possuem sub-populações de células resistentes, embora isto possa ser uma pequena parte, que conseguem crescer em altas concentrações do antibiótico) (GERBERDING et al., 1991 apud CHAMBERS, 1997) e cepas borderline que não contém o gene *mecA*, sendo que estas podem ser diferenciadas fenotipicamente das extremamente heterogêneas e *mecA* positivas, pois nas primeiras, clones altamente resistentes não ocorrem. Cepas borderline *mecA*-negativas podem ter surgido hipoteticamente da modificação dos genes regulares de PLP ou fruto de uma hiperprodução da  $\beta$ -lactamase estafilocócica (TOMASZ et al., 1989 apud CHAMBERS, 1997).

Além disso, o mecanismo de resistência à meticilina é complexo e envolve a regulação por uma série de genes e seus produtos. O plasmídeo estafilocócico de  $\beta$ -lactamase pode afetar a resistência de várias maneiras. Pode evitar a supressão espontânea do *mec* do cromossoma (HIRAMATSU et al., 1990 apud CHAMBERS, 1997), o que pode produzir um fenótipo suscetível. A introdução de um plasmídeo  $\beta$ -lactamase em cepas homogeneamente resistentes pode levar a um padrão heterogêneo de resistência (BOYCE et al., 1990; HARCKBARTH, MIICK e CHAMBERS, 1994 apud CHAMBERS, 1997). Os genes regulatórios da  $\beta$ -lactamase podem afetar a expressão da resistência. Mutações alterando a inducibilidade da  $\beta$ -lactamase têm sido associadas com a redução da resistência à meticilina (COHEN, GIBSON e SWEENEY, 1972 apud CHAMBERS, 1997). Cepas contendo genes reguladores do *mec* funcionais produzem pouca ou nenhuma PLP 2a basalmente e são mal induzidas por muitos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e a indução é lenta quando ocorre, de modo que a expressão de resistência é relativamente ou totalmente suprimida (RYFFEL, KAYSER e BERGER-BÄCHI, 1992; KUWAHARA-ARAI et al., 1996 apud CHAMBERS, 1997). Mutações na região promotora de *mecA* que afetam a ligação do repressor a sua região operadora, alteram a transcrição de genes de modo que pouca ou nenhuma PLP 2a é produzida e/ou mutações genéticas estruturais que tornam a proteína expressa não funcional, resultam em um fenótipo suscetível (CHAMBERS, 1997).

Apesar de toda a possibilidade de resultados falso positivos ou falso negativos em relação à determinação de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina apenas se baseando em testes que levam em consideração seu fenótipo de resistência, segundo Chambers (1997) não há dados clínicos que sugiram que o nível de resistência expressado por cepas *mecA* negativas

borderline levem a uma ineficácia do tratamento clínico. Além da dificuldade na diferenciação de cepas *mecA*-negativas das cepas *mecA*-positivas em cepas expressando resistência borderline, o fenômeno é provavelmente de baixo ou nenhum significado clínico. Isto é mais um fator que demonstra que a determinação da resistência à meticilina, baseada na pesquisa do gene *mecA* fornece, de forma segura, a real situação de resistência de cepas de estafilococos.

Além destes dados, diversos estudos vêm fornecendo dados a respeito da contaminação de alimentos por cepas MRSA: Kitai et al. (2005) obtiveram dois isolados MRSA (0,5%) de 444 produtos à base de carne de frango crua vendidos nos supermercados do Japão. Um estudo realizado na Coreia, incluindo 930 abatedouros e amostras de carne, mostrou a presença de MRSA em duas amostras de carne de frango (0,2%), mas não em amostras de carne suína ou bovina (KWON *et al.*, 2006). Van Loo et al. (2007) encontraram dois (2,5%) isolados MRSA em 79 amostras de carne de porco crua e carne bovina. Nestes estudos a presença de *S. aureus* em alimentos foi investigada e os isolados foram testados para a presença do gene *mecA* (CORRENTE et al., 2007). Boer et al. (2009), usando um método direto para a detecção de MRSA, analisaram 2.217 amostras e obtiveram 264 (11,9%) isolados MRSA destas amostras. Os maiores percentuais foram encontrados em carne de peru, frango e bovinos. Foi avaliada a presença do gene *mecA* em alimentos por Normanno et al. (2007), que obtiveram 160 isolados de *S. aureus* a partir de alimentos de origem animal (leite, produtos lácteos, carne e produtos cárneos) e a partir destes isolados conseguiram detectar seis (3,75%) que carregavam o gene *mecA*. Quatro isolados eram de leite bovino, um era de queijo muçarela e um de queijo pecorino. Todos os MRSA eram também sintetizadores de enterotoxinas.

Outro importante aspecto da resistência bacteriana é a pesquisa de resistência a biocidas à base de quaternário de amônio. A resistência a biocidas é de interesse na área médica, especialmente se observada resistência cruzada com antibióticos, como já foi relatado em *Staphylococcus* spp. isolados na indústria de alimentos e também em *Pseudomonas aeruginosa* (SIDHU et al., 2001; SIDHU et al. 2002).

No presente estudo foi realizada a pesquisa do gene *qacA/B* relacionado à resistência à biocidas catiônicos nas espécies de estafilococos. Dentre os 95 isolados estudados, nenhum apresentou o gene *qacA/B* através da reação em cadeia da polimerase. McKay (2008) obteve oito isolados de *Staphylococcus* spp. carregando o gene *mecA* através do enriquecimento com oxacilina de 70 amostras de leite não pasteurizados. Todos os isolados eram SCN e carregavam genes de resistência a outros antibióticos em adição ao *mecA*. Dois isolados *S. epidermidis* continham o gene *qacA/B*. Este estudo demonstrou que genes de resistência à desinfetantes à



base de quaternário de amônio podem ocorrer em *S. epidermidis*, que também possuam o gene *mecA* e sejam resistentes à oxacilina. Segundo este autor, a habilidade de *Staphylococcus* spp. resistir a agentes antimicrobianos poderia resultar em crescimento seletivo destas bactérias em ambientes de produção de alimentos contendo estes agentes, com o aumento potencial da transferência destes genes para outros *Staphylococcus* spp., incluindo patógenos humanos mais virulentos.

Outros estudos também obtiveram estafilococos carregando gene de resistência a compostos quaternário de amônio a partir da indústria de alimentos, como o caso de Heir, Sundheim e Holck (1999), que determinaram a resistência a antibióticos de 24 isolados contendo genes QAC de diferentes espécies de estafilococos obtidos da indústria de alimentos e demonstram que a resistência à ampicilina e penicilina foi prevalente em estafilococos contendo os genes *qacA/B*. Bjorland et al. (2005) demonstraram uma ampla distribuição de genes mediando resistência aos compostos quaternário de amônio em estafilococos a partir de leite pasteurizado em 127 amostras de gado leiteiro e de 70 de caprinos leiteiros. Os genes de resistência a compostos quaternário de amônio foram identificados em 27 (21,3%) de leite bovino e em 70 (10%) de leite caprino. Neste estudo, 29 isolados se mostraram resistentes à penicilina, porém todos se mostraram sensíveis à oxacilina.

Em um estudo realizado por Smith, Gemmell e Hunter (2007) no qual se pesquisou a presença de genes de resistência a quaternário de amônio em isolados de MRSA adquiridos de hospitais e da comunidade, os isolados obtidos da comunidade não apresentaram estes genes. O fato de não ter sido encontrado o gene *qacA/B* no presente estudo sugere que ou este tipo de desinfetante está sendo usado de maneira adequada na indústria de produção de queijo Minas Frescal (em relação à sua concentração e tempo de contato com as superfícies) ou não está sendo utilizado. Em condições práticas, a maioria dos problemas em relação à desinfecção passa a ser relacionado à pseudo-resistência. É difícil definir exatamente onde a variação natural de tolerância deve terminar e uma resistência começar. Deve-se separar a verdadeira resistência de pseudo-resistência, que é principalmente causada por erros na aplicação de desinfetantes. A verdadeira resistência é um evento bastante raro, enquanto pseudo-resistência é frequente. A resistência verdadeira pode ser adquirida em condições naturais ou pode ser artificialmente aumentada em laboratório, e é geneticamente determinada por plasmídeos ou pelo cromossoma. A adaptação é uma resistência intermediária causada por condições fisiológicas do biotipo de micro-organismo. A resistência adaptativa é perdida rapidamente logo que as condições fisiológicas forem alteradas (HEINZEL, 1998). A escolha de um desinfetante com um espectro de ação apropriado, para evitar problemas com resistência intrínseca de micro-organismos é o primeiro passo para a criação de um plano de higiene

adequado. A adaptação da frequência de limpeza e desinfecção para evitar a formação de biofilmes é outro ponto crucial. A aplicação de desinfetantes que garanta contato com as superfícies a serem desinfetadas com concentração adequada pode prevenir o desenvolvimento de adaptação por parte das bactérias aos desinfetantes. O risco na cadeia produtiva de alimentos causado pela resistência a biocidas é considerado baixo se estas substâncias estão sendo utilizadas de maneira apropriada (MEYER, 2006).

Em relação à pesquisa do gene *femA*, 35 (36,8%) isolados possuíam este gene, sendo que destes, 32 (91,4%) não possuíam o gene *mecA* (incluindo um isolado SCN) e apenas 3 (8,6%) possuíam este gene. Os primers utilizados para a pesquisa do gene *femA* foram específicos para *S. aureus*, portanto apenas os isolados que possuíam este gene eram realmente *S. aureus*. Porém, um isolado SCN demonstrou a presença do gene *femA*, o que também já foi relatado em um estudo realizado por Veras et al. (2008), no qual 15 isolados de SCN foram testados para a presença do gene *coa* (relacionado com a coagulase) e do gene *femA*. Três isolados SCN não amplificaram o gene *coa*, porém amplificaram o gene *femA*.

Em um estudo feito por Vannufel et al. (1999) foi demonstrado que genes homólogos para *femA* estão presentes em *S. aureus* e em certos isolados de SCN. Um gene homólogo de *femA* já foi caracterizado em *S. epidermidis*, demonstrando a possibilidade da conservação filogenética de *femA* nas espécies estafilocócicas. A organização genética de todos esses genes *femA* aparenta uma alta conservação, com alternância de regiões homólogas e variáveis. A homologia da sequência de ácidos nucleicos neste estudo esteve em torno de 75.1% a 78.3% entre *S. aureus* e espécies de SCN (VERAS et al., 2008).

O presente estudo demonstrou a existência de isolados possuindo ao mesmo tempo o gene *mecA* e o fenótipo de resistência para este antibiótico, incluindo dois isolados SCN. Estes resultados fornecem a indicação de que os queijos Minas Frescal de onde estes isolados foram oriundos estão passando por uma contaminação durante seu processamento, armazenagem ou transporte, com possibilidade de serem advindos de manipuladores destes alimentos.

A real importância da presença deste tipo de resistência em alimentos ainda é incerta apesar de autores como Khan et al. (2000), Pesavento et al. (2007) e Pereira et al. (2009) já terem afirmado que os alimentos são importantes fatores de transferência de resistência a antibióticos e que esta transferência pode ocorrer através de resíduos de antibióticos em alimentos, levando à seleção de cepas resistentes no trato gastrointestinal do consumidor, pela transferência de patógenos alimentares resistentes no alimento e pela ingestão de microbiota resistente junto com o alimento e subsequente transferência de resistência a micro-organismos patogênicos.

Normalmente adquire-se um grande número de micro-organismos com a ingestão de alimentos. A imensa maioria da microbiota do meio ambiente e dos alimentos é completamente inofensiva ao homem. Em geral, apenas os germes que têm características de patogenicidade são capazes de causar manifestações patológicas no organismo, ou então isso ocorre quando um grande número de agentes, considerados oportunistas, é ingerido e altera a microbiota do trato gastrointestinal. A aquisição de bactérias resistentes a partir de alimentos de origem animal, em um indivíduo imunocompetente, deve superar os mecanismos de defesa do organismo, como o pH, enzimas estomacais, muco, peristaltismo, competição microbiana pelo nicho de crescimento com micro-organismos já adaptados, sistema imune nos tecidos, epitélio intestinal, neutrófilos, imunoglobulinas IgG e IGM circulatórios (NETO e ALMEIDA, 2006).

A imunidade do hospedeiro deve ser considerada como um importante fator no processo de infecção. Em muitas partes do mundo o número de indivíduos imunocomprometidos vivendo na comunidade está crescendo, sendo que estes indivíduos possuem maior risco de aquisição de doenças veiculadas por alimentos, assim como estas doenças podem se apresentar com maior severidade para os mesmos (SCOTT, 2003). A ocorrência de cepas consideradas resistentes aos antimicrobianos é fato preocupante quando observadas as características de patogenicidade da bactéria em questão e quando há a possibilidade de infecções extra-intestinais decorrentes de gastroenterites em grupos mais sensíveis da população, como crianças, idosos, imunossuprimidos e imunocomprometidos (VARNAM e EVANS, 1991).

Existem evidências sugerindo que, além da heterogeneidade da resposta imunológica humana, a composição química dos alimentos pode influenciar a dose infectante de micro-organismos necessária para causar doença. Alimentos com grandes porcentagens de lipídeos podem encapsular e proteger os patógenos da ação letal da acidez gástrica. A ação de dispersão dos sais biliares podem de forma subsequente liberar os patógenos encapsulados no duodeno (BLOCK, 2001).

O fato de um grande número de estudos relatarem o isolamento de estafilococos possuindo resistência à metilina e a vários outros antibióticos utilizados na prática clínica, aliados ao relato clínico feito por Kluytmans et al., (1995), a respeito de uma septicemia desenvolvida por uma paciente imunossuprimida em um hospital que teve como provável causa a ingestão de um alimento contaminado por *Staphylococcus* spp. possuindo resistência à metilina, devem ser levados em consideração em avaliações de riscos visando o fornecimento de alimentos seguros para pacientes imunossuprimidos e novos estudos devem

ser conduzidos visando elucidar a ocorrência de riscos para os consumidores pela ingestão de alimentos contendo estafilocos resistentes à meticilina.

Na RDC n°12 de 2001 (BRASIL, 2001) existe uma categoria de alimentos para grupos populacionais específicos, na qual um dos grupos de alimentos é destinado a imunossuprimidos e imunocomprometidos, na qual é preconizada a pesquisa de estafilococos coagulase positiva/g, cuja tolerância para amostra indicativa é de 10 UFC de estafilococos coagulase positiva/g de alimento. Como foi visto nesse trabalho, isolados SCN também podem representar um risco, seja pela produção de enterotoxinas ou pela presença de cepas possuindo resistência a antibióticos, inclusive à meticilina. Portanto isto nos leva a sugerir a inclusão da pesquisa destes SCN nos alimentos destinados a imunossuprimidos. Em relação ao queijo Minas Frescal, o consumo mais seguro por imunossuprimidos seria o de queijos que passam pelo processo de ultrafiltração, pelo menos no aspecto de uma maior eficácia deste tipo de metodologia de produção para a proteção contra isolados de *Staphylococcus* spp. patogênicos.

## 6 CONCLUSÕES

1. Os isolados de *Staphylococcus* spp. analisados neste estudo apresentaram multirresistência aos antimicrobianos fenotipicamente e suscetibilidade à meticilina, e alguns também multirresistentes fenotipicamente e resistentes a este antibiótico. A veiculação deste tipo de micro-organismo resistente nestes alimentos, provenientes de leite pasteurizado, tem como provável causa manipuladores de alimentos na cadeia produtiva de queijo Minas Frescal.

2. Foram encontrados isolados de estafilococos que possuem tanto o gene *mecA* quanto o fenótipo de resistência à meticilina, ou seja, com potencial de resistir a tratamentos de antibioticoterapia caso consigam causar infecção ao consumidor através da ingestão.

3. A PCR mostrou-se como a técnica mais segura para avaliação de isolados de estafilococos possuindo resistência à meticilina, pois elimina a incerteza causada pela expressão heterogênea de resistência pelos métodos fenotípicos, portanto seu uso deve ser estimulado por laboratórios de microbiologia que estejam produzindo este tipo de resultado.

4. A resistência a biocidas à base de quaternário de amônio não ocorreu nos isolados de estafilococos obtidos de queijo Minas Frescal analisados neste estudo (ausência da detecção do gene *qacA/B*), o que demonstra que nas indústrias de queijos de onde foram obtidas as amostras o uso destes grupos de biocidas está sendo adequado, ou os mesmos não estão sendo utilizados. Devido a relatos de presença do gene *qacA/B* em outros estudos a partir de alimentos, sua pesquisa deve ser estimulada para se confirmar a real prevalência deste tipo de resistência no Brasil.

5. Foram obtidos SCN possuindo fenótipo de resistência à meticilina, ou seja, estes devem ser levados em consideração nos planos de análise de risco para alimentos devido ao seu potencial enterotoxigênico e pela possibilidade de possuir e transmitir resistência a antimicrobianos. Além disso, a discussão sobre a sua inclusão como um dos critérios microbiológicos pela RDC nº12 de 2001 deve ser também estimulada.

6. Os queijos Minas Frescal que foram elaborados através do processo de ultrafiltração avaliados no estudo realizado por Freitas (2005) não apresentaram *Staphylococcus* spp. contaminando o produto. Queijos elaborados por esse processo deve ser a escolha de consumo

por indivíduos imunossuprimidos/imonocomprometidos visando à proteção quanto aos microorganismos patogênicos deste gênero.

## REFERÊNCIAS

- ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, p. 489-493, 2003.
- AL BUSTAN, M. A.; UDO, E. E.; CHUGH, T. D. Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait City. **Epidemiology and Infection**, v. 116, n. 3, p. 319-322, 1996.
- ALAM, M. M.; ISHINO, M.; KOBAYASHI, N. Analysis of genomic diversity and evolution of the low-level antiseptic resistance gene *smr* in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, (Suppl. 1), S1-S7, 2003.
- ALAM, M.M.; KOBAYASHI, N.; UEHARA, N.; WATANABE, N. Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, n. 9, p. 109-121, 2003.
- ALBUQUERQUE, W. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F. Multiple drug resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a fish market and from fish handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 131-134, 2007.
- ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A.; Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista Saúde Pública**, v. 34, n. 6, 2000.
- ANDRÉ, M.C.D.P.B.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, L.J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; SERAFINI, A.B.; Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 200-207, 2008.
- ANVISA. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde- Rede RM. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede\\_rm/2009/100709\\_perfil\\_sensibilidade.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm) Acessado em: 29/12/2009.
- 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, **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 105–113, 2001.
- AYÇIÇEK, H.; AYDOĞAN, H.; KÜÇÜKKARAASLAN, A.; BAYSALLAR, M.; CELAL BAŞUSTAOĞLU, A. Assesment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. **Food Control**, v. 15, p. 253-259, 2004.
- AYLIFFE, G. A. J. Control of *Staphylococcus aureus* and Enterococcal Infections. In: **Disinfection, sterilization and preservation**, Editor: Seymour S. Block. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001. Cap. 24, 1481.

AYLIFFE, G. A. J. et al. Revised guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: report of a Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, the Hospital Infection Society and the Infection Control Nurses Association. **Journal of Hospital Infection**, v. 39, p. 253-290, 1998.

BAQUERO, F.; NEGRI, M. C.; MOROSINI, M. I.; BLAZQUEZ, J. Antibiotic-selective environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 5-11, 1998.

BAUTISTA, L.; TAYA, P. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 566-569, 1988.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic Syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p. 2548-2553, 1998.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 15. ed. São Paulo: Nobel, 1991. 320p.

BENNETT, R. W. ; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual** (8th –Revision A). Arlington: AOAC/FDA, 1998, pp. 12.01-12.05.

BENSON, T.E.; PRINCE, D. B.; MUTCHLER, V. T.; CURRY, K. A .; HO, A . M.; SARVER, R. W.; HAGADORN, J. C.; CHOI, G. H., GARLICK, R. L. X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus femA*. **Structure**, v. 10, n. 8, p. 1107-1115, 2002.

BHAKDI, S.; TRANUM - JENSEN, J. Alpha - toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 4, p. 733–751, 1991.

BJORLAND, J.; STEINUM, T.; KVITILE, B.; WAAGE, S.; SUNDE, M.; HEIR, E. Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4363-4368, 2005.

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

BLOCK, S.S. Definition of terms. In: Disinfection, sterilization, and preservation. 5. ed. Phyladelphia: Lippincott Williams e Williams (ed), 2001. p.19.

BOER, E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; WIT, B.; HUIJSDENS, X. M., NEELING, A.J., BOSCH, T.; VAN Oosteron, R. A. A.; VILA, A.; HEUVELINK, A. E. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 52-54, 2009.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO: Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2004, de 28/12/2005. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf)>. Acesso em: 29 dez. 2009.



BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun 2008. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/11794/8312>. Acesso em: 29 dez. 2009.

BOYCE, J. M.; MEDEIROS, A. A.; PAPA, E. F.; O'GARA, C. J. Introduction of beta-lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, p. 73–81, 1990.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRASIL. Lei nº8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configure infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº4 de 1 de março de 2004. Altera a portaria nº352 de 4/09/1997. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p.5, 5 mar. 2004. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº50/06, que consta em anexo à presente resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 de março de 2007.

BRASIL. Portaria nº352 de 4 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 13-68, 8 set. 1997b. Seção I.

BROWN, D. F. J.; REYNOLDS, P. E. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v.122, p.275–278, 1980.

BRYAN, F. L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 663-673, 1998.

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 320-324, 2002.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E., PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheeses and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CHAMBERS, H. F.; HACKBARTH, C. J. Effect of NaCl and nafallin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.424-428, 1989.

CHAMBERS, H. F.; SACHDEVA, M. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 1170–1176, 1990.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiological Review**, v. 10, p. 781-791, 1997.

CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

CHASTRE, J. Evolving problems with resistant pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p. 3–14, 2008.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 66–73, 2008.

CLSI. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobiana por Disco-Difusão**: Norma Aprovada- Oitava Edição. M2-A8, v. 23, n.1, 58p., 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf) . Acesso em: 4 jan. 2010.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. 37 p. (CLSI document M2-A9). ISBN 1562385860.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: eighteenth informational supplement. 18. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 181 p. (CLSI document M100-S18). ISBN 1562386530.

COHEN, S. C.; GIBSON, J.; SWEENEY, H. M. Phenotypic suppression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by mutant noninducible penicillinase plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 112, p. 682–689, 1972.

CORRENTE, M.; NORMANNO, G.; MARTELLA, V.; BELLACICCO, A.L.; QUAGLIA, N.C.; DAMBROSIO, A.; BUONAVOGLIA, D.; D'ABRAMO, M.; BUONAVOGLIA, C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 535–539, 2007.

COSTA, B. A. **Vigilância Sanitária: defesa e proteção da saúde**. São Paulo:USP, 1998. il. Tese (Doutorado)- Faculdade de Saúde da USP, Departamento de Práticas de Saúde Pública, São Paulo.

CREAGH, S.; LUCEY, B. Interpretative criteria for mupirocin susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. using CLSI guidelines. **British Journal of Biomedical Science**. v. 64, n.1, p.1-5, 2007.

DE BUYSER, M. L. ; DUFOUR, B. ; MAIRE, M. ; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.

DE JONGE, B.L.M.; YOON\_SEOK, C.; GAGE, D.; TOMASZ, A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 11248-11254, 1992.

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

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–93, 2002.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 1090- 1096, 2004.

EUSÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>> Acessado em 28 dez 2009.

FIGUEROA, G. G. ; NAVARRETE, P. W.; CARO, M. C. ; TRONCOSO, M. H. ; FAÚNDEZ, G. Z. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Revista Médica de Chile**, v. 130, n. 8, p. 859-864, 2002.

FISCHER, A.; FRANCOIS, P.; HOLTFRETER, S.; BROEKER, B.; SCHRENZEL, J. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 2, p. 184-190, 2009.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 63–70, 2001.

FORSYTHE, S. J., **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H.; **Fundamentals of cheese science**. 1 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. 587p.

FRANCO, B.D.G.M. Critérios Microbiológicos para Avaliação da qualidade de Alimentos. In: FRANCO, B. D. G.M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 8, p. 149-154.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* spp. isolados de queijo Minas Frescal**. Rio de Janeiro, 2005. 106p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

FREITAS, M. F. L.; LEAL BALBINO, T. C.; MOTA, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciência veterinária nos trópicos**, Recife, v. 7, p. 63-74, 2004.

GEORGOPADAKOU, N. H.; LIU, F. Y. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 5, p. 834- 836, 1980.

GEORGOPADAKOU, N. H. ; DIX, B. A. ; MAURIZ, Y. R. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 2, p. 333–336, 1986.

GERBERDING, J.L.; MIICK, C.; LIU, H. H.; CHAMBERS, H. F. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 12, p. 2575-2579, 1991.

GIBBS, S.G.; GREEN, C.F.; TARWATER, P.M.; MOTA, L.C.; MENA, K.D.; SCARPINO, P.V. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1032-1037, 2006.

GORDON, R.J.; LOWY, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 11, p. S350- S359, 2008.

GRINIUS, L.; DREGUNIENE, G.; GOLDBERG, E. B.; LIAO, C.-H.; PROJAN, S. J. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. **Plasmid**, v. 27, p. 119-129, 1992.

HACKBARTH, C. J.; MIICK, C.; CHAMBERS, H. F. Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 2578–2571, 1994.

HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 513–516, 1984.

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUND, K.; MÄKI-PETÄYS, N.; KORKEALA, H.J. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 11, p. 1487-1491, 2004.

HAYES, M. V.; CURTISS, N. A. C.; WYKE, A. W.; WARD, J. B. Decreased affinity of a penicillin-binding protein for beta-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 10, n. 2, p. 119–122, 1981.

- HEINZEL, M., Phenomena of biocide resistance in microorganisms. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 41, n. 3-4, p. 225-234. 1998.
- HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 378-388, 1999.
- HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, p. 49-56, 1998.
- HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.
- HIRAMATSU, K.; SUZUKI, E.; TAKAYAMA, H.; KATAYAMA, Y.; YOKOTA, T. Role of penicillinase plasmids in stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 600-604, 1990.
- HOFFMAN, F.L.; SILVA, J.V.; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.
- INPPAZ/OPS/OMS: SISTEMA DE INFORMACION PARA LA VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS – SIRVETA. Disponível em: <[http://www.panalimentos.org/sirvetaipz/report\\_eta01.asp](http://www.panalimentos.org/sirvetaipz/report_eta01.asp)>. Acesso em: 7 out. 2009.
- IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 302-310, 2008.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.
- JAY, J. M. Gastroenterites Estafilocócica. In: **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 23, p. 471-484.
- JONES, T.F.; KELLUM, M.E.; PORTER, S.S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 1, p. 82-84, 2002.
- KAHL, B.; HERRMANN, M.; EVERDING, A.S.; KOCH, H.G.; BECKER, K.; HARMS, E.; PROCTOR, R.A.; PETERS, G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1023-1029, 1998.
- 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*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1832-1838, 2000.

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. **Journal of veterinary and medical science**, v. 67, n. 1, p. 107-110, 2005.

KLOSS, W.E.; LAMBE JR., D.W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of Clinical Microbiology**. 5 ed. Washington: Am. Soc. Microbiol, 1991.

KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; ROST, J.; VAN LEEUWEN, N. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1121-1128, 1995.

KLUYTMANS-VANDERBERGH, M. F.; KLUYTMANS, J. A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**, V. 12, n. 1, p. 9-15, 2006.

KOPP, U.; ROOS, M.; WECKE, J.; LABISCHINSKI, H. Staphylococcal Peptidoglycan Interpeptide Bridge Biosynthesis: A Novel Antistaphylococcal Target? **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 1, p. 29-41, 1996.

KREISWIRTH, B.N.; SCHLIEVERT, P.M. e NOVICK, R.P. Evaluation of coagulase-negative staphylococci for ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 2028–2029, 1987.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N.K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **The Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225–1240, 2001.

KUWAHARA-ARAI, K.; KONDO, S.; HORI, E.; TATEDA-SUZUKI, and K. HIRAMATSU. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2680–2685, 1996.

KWON, N. H.; PARK, T. K.; MOON, J. S.; JUNG, W. K.; KIM, S. H.; KIM, J. M.; HONG, S. K.; KOO, H. C.; JOO, Y. S.; PARK, H. Y. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IV isolated from bovine milk in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 624-632, 2005.

KWON, N.H.; PARK, K.T.; JUNG, W.K.; YOUN, H.Y.; LEE, Y.; KIM, S.H.; BAE, W.; LIM, J.Y.; KIM, J.Y.; KIM, J.M.; HONG, S.K.; PARK, Y.H. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 304–312, 2006.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of action of biocides. In: Russel, A. D.; Hugo, W. B.; Ayliffe, G. A. J. **Principles and practices of disinfection, preservation and sterilization**. Editors: Adam P. Fraise, Peter A. lamberts, Jean-Yves Maillard. 4. ed. malden, M.A: Black-Well publishing, 2004.x, 678p.il.

LANCETTE, G. A. ; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus*. In: American Public Health Association, Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA: Washington, D. C., 2001 4<sup>th</sup> ed., pp.387-400.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 284-290, 2003.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003. Disponível em: <[http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0009\\_full\\_text.htm](http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0009_full_text.htm)>. Acessado em: 23 de agosto de 2008.

LEE, J.H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LEELAPORN, A.; FIRTH, N.; PAULSEN, I. T.; HETTIARATCHI, A.; SKURRAY, R. A. Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationships to *Staphylococcus aureus qacC* plasmids. **Plasmid**, v. 34, p. 62-67, 1995.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 38–43, 2003.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção de queijo Minas Frescal em uma indústria de laticínios**. Piracicaba: USP, 2005. 61p. il. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo.

LITTLEJOHN, T. G., D. DIBERARDINO, L. J. MESSEROTTI, S. J. SPIERS, and R. A. SKURRAY. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Gene**, v. 101, p. 59-66, 1991.

LITTLEJOHN, T. G.; PAULSEN, I. T.; GILLESPIE, M. T.; TENNENT, J. M.; MIDGLEY, M.; JONES, I. G.; PUREWAL, A. S.; SKURRAY, R. A. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 74, p. 259-265, 1992.

LIVEMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2000.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 27, p. 520–532, 1998.

- LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiological Reviewers**, v. 51, n. 1, p. 88-134, 1987.
- MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ, G.; MARRERO, A.; GARCÍA-PIQUÈ, S.; GÁRCIA-CASTELLANOS, R.; GOMES-RUTH, F.X. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 1-8, 2004.
- MANUAL da Qualidade. Pesquisa e Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva a Partir de Alimentos. Ver.03. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007. Seção 10. 28p. (65.3210.032).
- MAUBOIS, J.L.; MOCQUOT, G. Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 7, p. 1001–1007, 1975.
- MAYER, S.; BOOS, M.; BEYER, A.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.896-897, 2001.
- MCCORMICK, J.K.; YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 77–104, 2001.
- MCDONELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-79, 1999.
- MCKAY, A. M. Antimicrobial resistance and heat sensitivity of oxacillin-resistant, *mecA*-positive *Staphylococcus spp.* From unpasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 186-190, 2008.
- MCLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.
- MEYER, B. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 275-279, 2006.
- MIWA, N.; KAWAMURA, A.; MASUDA, T.; AKIYAMA, M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 361–366, 2001.
- MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Evaluation of bacterial contamination in disinfectants for domestic use. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-9102000000500003&lng=en&enrm=iso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-9102000000500003&lng=en&enrm=iso)>. Acesso em: 30 Maio de 2008.
- MIYAZAKI, N. H. T. **Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina**. Rio de Janeiro: INCQS, 2006. Tese



(doutorado) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Disponível em: <http://teses.cict.fiocruz.br/cgi-bin/wxis1660.exe/lildbi/iah/> Acessado em: 22/09/2008.

MIYAZAKI, N. H. T.; ABREU, A.; MARIN, V. A.; REZENDE, C. A. F.; MORAES, M. T. B.; VILLAS BÔAS, M. H. S. The presence of *qacA/B* gene in Braz methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102(4), p. 539-540, 2007.

MONSEN, B.A.; OLOFSSON, C.; GRASTRÖM, S.; WISTRÖN, J. A preliminary evaluation of a new selective agar supplemented with desferrioxamine for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, p. 216-221, 2003.

MOON, J. -S.; LEE, A. -R.; KANG, H. -M.; LEE, E. -S.; KIM, M. -N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. -S.; KOO, H. C. Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1176-1185, 2007.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J.; WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3337–3348, 1998.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H., **Manual of Clinical Microbiology**, Vol. 1, Ed. 8<sup>th</sup>, Washington, D. C, 2003, 762 p.

NATAL, S. Emergência da resistência às drogas. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 10, n. 2, p. 57-70, 2002.

NAVRATNA, V.; NADIG, S.; SOOD, V.; PRASAD, K.; ARAKERE, G.; GOPAL, B. Molecular basis for the role of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 4 in antimicrobial resistance. **Journal of Bacteriology**, 2009 0:JB00822-09. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/JB.00822-09v1>> Acessado em: 02/01/2010.

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

NG, E. Y. W.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1345-1355, 1994.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 328-88, 1994.

NOGUCHI, N., OKADA, H.; NARUI, K.; SASATSU, M. Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, p. 197-203, 2004.

NOGUCHI, N.; HASE, M.; KITTA, M.; SASATSU, M.; DEGUCHI, K.; KONO, M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, n. 2, p. 247-253, 1999.

NOGUCHI, N.; NAKAMINAMI, H.; NISHIJIMA, S.; KUROKAWA, I.; SO, H.; SASATSU, M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2119-2125, 2006.

NOGUCHI, N.; OKIHARA, T.; NAMIKI, Y.; KUMAKI, Y.; YAMANAKA, Y.; KOYAMA, M.; WAKASUGI, K.; SASATSU, M. Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 374-379, 2005.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A. L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 219-222, 2007.

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 585-594, 2001.

OLSVIK, O.; FOSSUM, K.; BERDAL, B.P. Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strains within the family *Micrococcaceae*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology**, v. 90B, n. 1-6, p. 441-444, 1982.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 6088-6094, 2003.

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

OMOE, K.; IMANISHI, K.; HU, D.L.; KATO, H.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3664-3667, 2004.

ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNANDEZ, J.; DOMENECH, A.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. Production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1 by coagulase-negative staphylococci isolated from ruminant mastitis. **Journal of veterinary medicine series B**, v. 39, n. 2, p. 144-148, 1992.

ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.; GUTIERREZ, J.A.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.; TRIPP, T.J.; BOHACH, G.A.; EARHART, C.A.; OHLENDORF, D.H.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of a novel staphylococcal

enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. **Biochemistry**, v. 41, p. 14033–14040, 2002.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.; DONAHUE, H.L.; NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360–366, 2001.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; HOOK, M. MSCRAMM - mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 585–617, 1994.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; LITTLEJOHN, T. G.; MITCHELL, B. A.; SKURRAY, R. A. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 3630-3635, 1996.

PEREIRA, M. L.; LARA, M.A.; DIAS, R. S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo “tipo Minas”. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 4, p. 349-350, 1991.

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 Microbiology**, v. 26, p. 278-282, 2009.

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

PRÉVOST, G.; COUPPIÉ, P.; MONTEIL, H. Staphylococcal epidermolysins. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 71–76, 2003.

PROCTOR, R. A.; PETERS, G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 419–22, 1998.

PUTMAN, M.;VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N.. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 672-693, 2000.

RABATSKY-HER, T.; ROSSITER, J.W.; HOLLAND, S.B.; STAMEY, K.; HEADRICK, M.L.; BARRETT, T.J.; FREDERICK, A.J. Multidrug-resistant Strains of *Salmonella enterica* Typhimurium, United States, 1997-1998. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 795- 801, 2004.

REN, K.; BANNAN, J. D.; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A. L.; ROBBINS, J. C.; FISCHETTI, V. A.; ZABRISKIE, J. B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 1675-1683, 1994.

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

REYNOLDS, P. E. The essential nature of staphylococcal penicillin binding proteins. In: ACTOR, P.; DANELO-MOORE, L.; HIGGINS, M. L.; SALTON, M. R.; SHOCKMAN, G. D. (ed.), **Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 343-351, 1988.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

ROSSI, L.; TONIN, E.; CHENG, Y.R.; FONTANA, R. Regulation of penicillin-binding protein activity: description of a methicillin-inducible PBP in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 5, p. 828-831, 1985.

ROUCH, D. A., CRAM, D. S.; DIBERARDINO, D.; LITTLEJOHN, T. G.; SKURRAY, R. A. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 2051-2062, 1990.

RUSSEL, A. D. Do biocides select for antibiotic resistance? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p.227-233, 2000.

RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHCHI, B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 25-31, 1992.

SABATH, L. D.; WALLACE, S. J. Factors Influencing methicillin resistance in staphylococci. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 236, p. 258-266, 1974.

SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas-frescal. **Higiene Alimentar**, v. 12, p. 48-50, 1998.

SANTOS, A .L. **Comportamento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal fabricado com leite cru**. Lavras: UFL, 2004. 54p. il. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology e Infection**, v. 12, n. 1, p. 3-8, 2006.

SCOTT, E. Food safety and foodborne disease in 21<sup>st</sup> century homes. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, 2003.

SIDHU, M. S.; HEIN, E.; LEEGARD, T.; WIGER, K.; HOLCK, A . Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with  $\beta$ - lactamase transposon *Tn552* among clinical staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2797-2803, 2002.

SIDHU, M. S.; HEIR, E.; SORUM, H.; HOLCK, A. Genetic Linkage Between Resistance to Quaternary Ammonium Compounds and  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Food-Related *Staphylococcus* spp. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 4, p. 363-371, 2001.

SIEVERT, D. M., BOULTON, M. L., STOLTMAN, G., JOHNSON, D., STOBIERSKI, M.G., DOWNES, F.P., SOMSEL, P.A., RUDRIK, J.T., BROWN, W., HAFEEZ, W., LUNDSTROM, T., FLANAGAN, E., JOHNSON, R., MITCHELL, J., CHANG, S. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v. 51, p. 565–567, 2002.

SILVA, I.M.N.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A .O.; ALMEIDA, P.F. Ocurrance of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-48, 2003.

SILVA, M.C.D.; HOFFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 354-356, 1998.

SMITH, K.; GEMMEL, C. G.; HUNTER, I. S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, JAC Advance Access published on November 2, 2007, DOI 10.1093/jac/dkm395.

SOARES, M. J. S. ; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H. ; NOLETO, A. L. S. ; FIGUEIRED, A. M. S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 214-221, 1997.

SOTO, A.; SALDÍAS, M. E.; OVIEDO, P.; FERNÁNDEZ, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* among food handlers from a metropolitan university in Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 124, n. 9, p. 1142-1146, 1996.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 195-202, 1997.

SU, Y.C.; WONG, A.C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1438–1443, 1995.

SUTHERLAND, R.; BOON, R. J.; GRIFFIN, K. E.; MASTERS, P. J.; SLOCOMBE, B.; WHITE, A. R. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 495–498, 1985.

SUZUKI, Y.; SAITO, M.; ISHIKAWA, N. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 271-274, 1999.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, 2000.

TENNENT, J. M.; LYON, B. R.; MIDGLEY, M.; JONES, I. G.; PUREWAL, A. S.; SKURRAY, R. A. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding

antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 1-10, 1989.

THOMAS, D.; CHOU, S., DAUWALDER, O. LINA, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. In: Marone, G. (Ed.), **Superantigens and Superallergens: Chemical Immunology and Allergy**, ed. Karger: Basel, 2007. p. 24-41.

THORBERG, B. M.; AARESTRUP, F. M.; BRÄNDSTRÖM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON- THARM, M. L. Pheno and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 163-172, 2006.

TIMMERMAN, C. P. ; MATTSSON, E. ; MARTINEZ - MARTINEZ, L. ; DE GRAAL, L ; VAN STRIJP, J. A. ; VERBRUGH, H. A. ; VERHOEF, J.; FLEER, A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 4167–4172, 1993.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H. B.; DE LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; MCDUGAL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1899–1874, 1989.

TONDO, E. C.; GUIMARÃES, M. C. M.; HENRIQUEZ, J. A. P.; AYUB, A. Z. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1108-1114, 2000.

TUNG, H.; GUSS, B.; HELLMAN, U.; PERSSON, L.; RUBIN, K.; RYDEN, C. A bone sialoprotein - binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. **Biochemical Journal**, v. 345, p. 611-619, 2000.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 819–823, 1999.

UPTON, A.; LANG, S.; HEFFERNAN, H. Mupirocin and *Staphylococcus aureus*: a recent paradigm of emerging antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 613-617, 2003.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 397–403, 1985.

VAN LOO, I. H. M.; DIEDEREN, B. M. W.; SAVELKOUL, P. H. M.; WOUDEBERG, J. H. C.; ROOSEDAAL, R.; VAN BELKUM, A.; LEMMENS-DEN TOOM, N.; VERHULST, C.; VAN KEULEN, P. H. J.; KLUYTMANS, J. A. J. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1753–1755, 2007.

VANNUFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOUYER, M.; VANDERCAM, B.; PHILIPPE, M.; GALA, J-L. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus*

*hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Research in Microbiology**, v.150, p.129-141, 1999.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens. An illustrated text**. Aylesbury: Wolf Publishing Ltd, 1991.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.M.; HUARD, C.; PÉPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 69-79, 2003.

VERAS, J. F.; DO CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271–280, 1996.

WEESE, J. S.; DUIJKEREN, E. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, 2010.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A. E.; ENRIGHT, M. C.; NOTO, M.; CRAIG, W.; ARCHER, G. L. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3574–3579, 2003.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 3, p. 2–21. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne Disease Surveillance: Antimicrobial Resistance. Disponível em: [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/en/index.html](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/index.html). Acessado em: 04 jan.2010.

WU, S.; PISCITELLI, C.; LENCASTRE, H. de; TOMASZ, A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 4, p. 435–441, 1996.

YARWOOD, J.M.; MCCORMICK, J.K.; PAUSTIAN, M.L.; ORWIN, P.M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13138–13147, 2002.

YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, S.; UBUKATA, K.; KONNO, M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6942-6949, 1990.

YÜCEL, N., ÇITAK, S., ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, n. 2-3, p. 241-245, 2005.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 227–233, 1998.



## ANEXO A

### MEIOS DE CULTURA

#### 8.1 Ágar tripticaseína de soja

Peptona de caseína.....	15g
Peptona de soja.....	5g
Cloreto de sódio.....	5g
Ágar.....	15g
Água purificada.....	1000mL

Suspender os componentes em água purificada e aquecer sob agitação até a completa dissolução do ágar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7,3± 0,2 a 25°C.

#### 8.2 Ágar nutriente

Extrato de carne.....	3g
Peptona.....	5g
Ágar.....	15g
Água purificada.....	1000mL

Suspender os componentes em água purificada e aquecer sob agitação até a dissolução.

Distribuir alíquotas de 3mL em tubos 13X100mm, esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Deixar o ágar solidificar em posição inclinada.

pH final: 6,8± 0,2 a 25°C.

#### 8.3 Caldo tripticaseína de soja

Peptona de caseína.....	17g
Peptona de soja.....	3g
Cloreto de sódio.....	5g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5g
Glicose.....	2,5g
Água purificada.....	1000mL

Suspender os componentes da fórmula em água purificada e aquecer sob agitação até a completa dissolução. Dispensar alíquotas de 50mL em frasco erlenmeyer com capacidade de 250mL. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

pH final: 7,3± 0,2 a 25°C.

#### 8.4 Ágar Mueller-Hinton

Extrato de carne.....	2g
Caseína hidrolisada.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Ágar.....	13g
Água purificada.....	1000mL

Suspender os componentes da fórmula em água purificada e aquecer sob agitação até a completa dissolução do Agar. Autoclavar sob condições brandas (115°C por 10 minutos).

pH final:  $7.4 \pm 0.2$  a 25°C