

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

MARIANA DE ANDRADE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL INDUSTRIAL E ARTESANAL**

Goiânia
2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG E NO BANCO DE TESES DA CAPES

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) e a Capes a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG) e banco de teses Capes, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Mariana de Andrade Ferreira		
E-mail:	marianadeandrade.nutri@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL INDUSTRIAL E ARTESANAL		
Palavras-chave:	<i>Staphylococcus aureus</i> , Resistência Microbiana a Medicamentos, Enterotoxinas, Microbiologia de Alimentos		
Título em outra língua:	PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLATED FROM MINAS CHEESE INDUSTRIAL AND ARTISANAL.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Staphylococcus aureus</i> ; Drug Resistance Microbiol, Enterotoxins, Food Microbiology.		
Área de concentração:	Nutrição e Saúde		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	28/08/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Nutrição e Saúde		
Orientador (a):	Maria Claudia Dantas Porfirio Borges André		
E-mail:	mcporfirio@hotmail.com		
Co-orientador (a):*	--		
E-mail:	--		

*Necessita do PF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização? ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

☐ Liberação para ambos (Capes e BDTD/UFG) ☐ Liberação apenas para BDTD/UFG

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Mariana de Andrade Ferreira
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 24 / 02 / 2016

1 Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MARIANA DE ANDRADE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL INDUSTRIAL E ARTESANAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cláudia Dantas
Porfirio Borges André

Linha de pesquisa: Qualidade de alimentos e dietas

Goiânia
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Ferreira , Mariana de Andrade
Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Staphylococcus aureus*
Isolados de Queijo Minas Frescal Industrial e Artesanal [manuscrito] /
Mariana de Andrade Ferreira . - 2015.
108 f.

Orientador: Profa. Dra. Dr^a Maria Claudia Dantas Porfirio Borges
André .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
de Nutrição (Fanut) , Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde,
Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. cheese. 3. antimicrobial resistance. 4.
staphylococcal enterotoxin.. I. André , Dr^a Maria Claudia Dantas
Porfirio Borges , orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

MARIANA DE ANDRADE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL INDUSTRIAL E ARTESANAL**

**Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 28 de agosto de 2016, pela
Banca Examinadora constituída pelos membros:**

Profª Drª..Maria Raquel Hidalgo Campos
FANUT/UFG

Profª Drª Liana Jayme Borges
FANUT/UFG

Profª Drª Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André
FANUT/UFG (orientador)

Membros suplentes:

Profª Drª Juliana Lamaro Cardoso
IPTSP/UFG

Profª Drª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga
IPTSP/UFG

Dedico este trabalho aos meus pais, Mírian e Sebastião, que nunca mediram esforços para investir na minha educação, sempre acreditaram no meu empenho com motivação e carinho, e me transmitiram os ensinamentos de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Obrigada, Senhor, por me conceder a graça da vida e por permitir que eu trilhe meus caminhos sob sua regência, com fé e dignidade. Obrigada por mais essa conquista.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia D. P. B. André, expressei meu profundo agradecimento pela orientação e apoio. Sempre com seu jeito tranquilo, cheio de paciência e sabedoria. Agradeço pelos ensinamentos, sugestões, pelas valiosas correções e pela disponibilidade que sempre teve. Sem dúvida, é um grande exemplo de profissional e de pessoa. Professora, muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Hidalgo Campos, pelo apoio desde o início, pelas contribuições e ensinamentos valiosos.

À Prof^a. Dr^a. Liana Jayme Borges, que esteve presente na banca em todas as etapas avaliativas, desde o projeto até a defesa e muito contribuiu com seu saber e experiência.

Aos meus pais, Mírian P. de Andrade Ferreira e Sebastião Ferreira Júnior, pelo amor, incentivo, apoio e carinho durante essa fase de amadurecimento pessoal e profissional e em todos os outros momentos da minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim e no que faço. Sem vocês jamais chegaria aonde cheguei. Ainda falta muito chão para ser trilhado e sei que estarão sempre ao meu lado. Minha eterna gratidão a vocês.

À minha querida irmã Gabriela de Andrade, minha melhor amiga por opção. Obrigada pelo amor diário e por estar ao meu lado sempre.

À minha avó Maria Parreira, professora por formação, sempre motivou meu desenvolvimento intelectual e sempre foi uma grande incentivadora da leitura. Meu orgulho, meu exemplo. Obrigada, vizinha pelos seus ensinamentos, por me permitir aprender com você coisas novas sempre, por sempre acompanhar nossa (todos os netos) jornada de pertinho e fazer-se presente em todos os momentos.

Ao Guilherme Gouveia, pelo apoio e carinho diários, pela transmissão de confiança e de força, por entender minha frequente presença ausente, pela tolerância e amor.

A todas as minhas amigas, que sempre me apoiaram e estiveram do meu lado nesse processo.

À Isabella Lessa, amiga de longa caminhada e à Lívia Milhomem, amiga que o mestrado uniu, por participarem do meu projeto e estarem comigo nas coletas, no laboratório, por dividirem as angústias, aflições, o dia a dia, pela ajuda mútua, enfim, por fazer tudo ser mais leve.

À Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso, Larissa Gomes e à Lorrane Neves pela disponibilidade e apoio fundamentais nas análises.

Às companheiras de jornada, colegas do mestrado, que dividiram tantos momentos e experiências e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da UFG.

Ao Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos da Faculdade de Nutrição da UFG e ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

RESUMO

S. aureus é um importante patógeno de origem alimentar com capacidade de produção de toxinas extracelulares e resistência antimicrobiana. Entre os alimentos envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica, destaca-se o queijo, principalmente quando fabricado em condições higienicossanitárias impróprias. Os objetivos deste estudo foram caracterizar *S. aureus* isolados de queijo Minas frescal artesanal e industrializado, determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, bem como determinar a similaridade genética entre os isolados. Os isolados foram também testados para genes de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e outros fatores de virulência. Foram analisadas 56 amostras de queijo Minas frescal de fabricação artesanal e dez de fabricação industrial comercializados em feiras livres e supermercados de Goiânia-GO, coletadas entre junho e agosto de 2014. *S. aureus* foi confirmado em 19 amostras (33,9) de queijo artesanal através da detecção do gene *femA*, onde 29 isolados foram obtidos. Estes isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e classificados em nove diferentes perfis (A - I). Treze isolados (44,8%) foram resistentes à penicilina e três (10,3%) à tetracilina, sendo dois (7,4%) resistentes a ambos. A técnica de multiplex PCR foi realizada para a detecção de genes de virulência que codificam a produção de hemolisinas (Hla e Hlb), TSST-1, toxinas esfoliativas (ETa e ETb) e enterotoxinas (EEA - EEE, EEG - EEJ, EEM - EEO). Genes que codificam as toxinas TSST-1 e esfoliativa não foram detectados. Todos os isolados amplificaram para o gene *hla* e 14 (48,3%) para o gene *hlb*. O gene *seh* foi o mais frequentemente detectado (n=11; 37,9%), seguido do gene *seo* (n=3; 10,3%), genes *seg*, *sem*, *sen* (n=2; 6,9%) e os genes *sec* e *sei* (n=1; 3,4%). Um isolado (3,4%) amplificou genes para quatro enterotoxinas e outro (3,4%) para seis. A comparação dos 29 isolados de *S. aureus* feita por PFGE revelou 18 padrões de bandas diferentes de DNA agrupados em cinco clusters. A genotipagem demonstrou alta similaridade genética entre os isolados. Isolados idênticos foram obtidos de amostras diferentes e uma mesma amostra apresentou mais de um isolado geneticamente diferente. Identificou-se até quatro diferentes isolados da mesma amostra. A alta prevalência de *S. aureus* nas amostras de queijo Minas Frescal, bem como a detecção de genes para produção de toxinas, alertam para a necessidade de reduzir os níveis de contaminação neste tipo de queijo através de monitoramento e controle da produção e comércio do produto.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Resistência Microbiana a Medicamentos, Enterotoxinas, Microbiologia de Alimentos

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from Minas cheese industrial and artisanal.

Staphylococcus aureus is an important foodborne pathogen, able to produce extracellular toxins and to express antimicrobial resistance. Among the foods involved in staphylococcal food poisoning, stands out the cheese, especially when manufactured under improper hygienic and sanitary conditions. The objectives of this study were to characterize *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal and industrialized Minas frescal cheeses, to determine their antimicrobial susceptibility profile as well as the genetic similarity among the isolates. The isolates were also tested for staphylococcal enterotoxins (SE) genes and other virulence factors. Fifty-six artisanal raw milk cheeses sold at street fairs and 10 industrialized cheeses commercialized in supermarkets of Goiânia, Goiás were analyzed between June and August 2014. *S. aureus* was confirmed in 19 samples (33.9%) of artisanal cheese by detection of *femA* gene, in which 29 isolates were obtained. These isolates were submitted to the antimicrobial susceptibility test and classified into nine different profiles (A - I). Thirteen isolates (44.8%) were resistant to penicillin and three (10.3%) to tetracycline, with two (7.4%) resistant to both. The Multiplex PCR technique was performed to detect virulence genes that code for the production of hemolysins (Hla and Hlb), toxic shock syndrome toxin (TSST-1), exfoliative toxins (ETa and ETb) and enterotoxins (SEA - SEE, SEG - SEJ, SEM - SEO). Genes encoding TSST-1 and exfoliative toxins were not detected. All the isolates amplified for the *hla* gene and 14 (48.3%) for the *hbl* gene. The *seh* gene was the most frequently detected (n=11, 37.9%) followed by *seo* gene (n = 3; 10.3%), *seg*, *sem* and *sen* genes (n = 2, 6.9%) and *sec* and *sei* genes (n = 1, 3.4%). In one isolate (3.4%), four enterotoxins genes were detected, and in another, six (3.4%). The comparison performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis technique revealed 18 different DNA banding patterns which were grouped into five clusters. The genotyping found high genetic similarity among the isolates. Identical isolates were obtained from different samples and one sample showed more than one genetically different isolate. It was identified up to four different isolates from the same sample. The high prevalence of *S. aureus* in a widely consumed product like Minas fresh cheese, as well as the detection of toxin encoding genes identified in this study, warns of the necessity to reduce the contamination levels in this type of cheese through monitoring and controlling the production and trade of the product.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Cheese, Antimicrobial resistance, Staphylococcal enterotoxin.

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1.	Número de feiras livres distribuídas por Distritos Sanitários pertencentes ao Município de Goiânia – GO.....	36
Quadro 2.	Oligonucleotídeos usados na detecção de genes de virulência.....	40
Table 1	Primers used in multiplex PCR reactions for virulence genes detection.....	76
Table 2	Antimicrobial susceptibility profile of <i>S. aureus</i> isolated from artisanal raw milk cheeses sold in Brazilian street fairs.....	77
Table 3	Virulence genes detected in <i>S. aureus</i> isolated from artisanal raw milk cheeses sold in Brazilian street fairs.....	78
Figure 1	Clonal relationships, virulence and susceptibility profile of <i>S. aureus</i> isolated from raw milk cheese, established with <i>Sma</i> I PFGE analysis....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Atividade de água
agr	<i>Acessory gene regulator</i>
bp	<i>Base pair</i>
BP	<i>Baird-Parker Agar</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EE	Enterotoxinas Estafilocócicas
EEA	Enterotoxina Estafilocócica A
EEB	Enterotoxina Estafilocócica B
EEC	Enterotoxina Estafilocócica C
EED	Enterotoxina Estafilocócica D
EEE	Enterotoxina Estafilocócica E
EEG	Enterotoxina Estafilocócica G
EEH	Enterotoxina Estafilocócica H
ETA	<i>Exfoliative Toxin A</i>
ETB	<i>Exfoliative Toxin B</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fc	Fragmento cristalizável
HCl	Ácido Clorídrico
HLa	<i>Alpha-hemolysin</i>
HLb	<i>Beta-hemolysin</i>
IgG	Imunoglobulina G
LMP	<i>Low Melting Point</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OD	<i>Optical Density</i>
PBP	<i>Penicillin -Binding Protein</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
sar	<i>Staphylococcal accessory regulator</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	QUEIJO MINAS FRESCAL.....	15
2.2	ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA.....	17
2.2.1	Fatores de virulência.....	19
2.2.1.1	Enterotoxinas.....	21
2.2.1.2	Resistência aos antimicrobianos.....	24
2.3	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	26
2.4	CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA.....	28
2.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase.....	30
2.4.2	Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - PFGE).....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	TIPO E LOCAL DO ESTUDO.....	34
4.2	COLETA DE DADOS.....	34
4.3	LOCAL DAS ANÁLISES.....	36
4.4	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	36
4.4.1	Contagem de Estafilococos coagulase positiva.....	36
4.4.2	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos – Método de Disco-Difusão.....	36
4.5	TIPAGEM MOLECULAR.....	37
4.5.1	Extração do DNA bacteriano.....	37
4.5.2	Identificação molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	37
4.5.3	Deteção Molecular de Genes de Virulência.....	38
4.5.4	Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - PFGE).....	40
4.5.4.1	Condições de digestão e eletroforese.....	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4.7	ASPECTOS ÉTICOS.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO.....	55
	INTRODUÇÃO.....	58

MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
ANEXOS.....	83

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As ocorrências clínicas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos, substâncias químicas, toxinas, vírus, parasitas ou fungos, que propiciam a entrada de agentes contaminantes no hospedeiro, caracterizam as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (SILVA JUNIOR, 2005). As bactérias e suas toxinas são importantes contaminantes dos alimentos e bebidas e sua ingestão pode acarretar a ocorrência de DTA, caracterizadas principalmente por alterações gástricas, diarreia, febre e dores abdominais (SILVA JUNIOR, 2005).

No Brasil, a vigilância epidemiológica das DTA, entre os anos de 2000 a 2014, obteve registro de 9.719 surtos de DTA. A maioria destas enfermidades, neste período, foi causada pelos agentes etiológicos *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, sendo o *S. aureus* o segundo maior causador, identificado em 798 destes surtos. Dentre as classes de alimentos com maior proporção entre os surtos vale destacar o leite e seus derivados, com 356 casos notificados (ANVISA, 2014).

O *S. aureus*, dentre as bactérias agentes de intoxicação alimentar, se destaca por ser produtor das Enterotoxinas Estafilocócicas (EE), que apresentam alto potencial ativo e resistência a algumas condições como pH baixo e altas temperaturas, que destroem o micro-organismo mas não inativam a toxina, caso já esteja presente (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO, et al., 2010; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

A intoxicação alimentar estafilocócica representa uma das DTA mais prevalentes no mundo e é causada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos (ECDC, 2015). Sua real incidência muitas vezes é subestimada por razões como falhas no diagnóstico, coleta e exames inadequados, o que prejudica o controle social e econômico da doença (YAN et al., 2012).

Após a ingestão de alimentos que contenham EE, é possível notar sintomas de gastroenterite aguda como vômito e diarreia dentro de um período de duas a seis

horas (JOHLER et al., 2015). A severidade depende da quantidade de toxina ingerida e da suscetibilidade do indivíduo (SILVA; SAUER; KOLAR, 2009).

O ser humano é o reservatório natural de *S. aureus* (WINN et al., 2006). O gado bovino também é importante portador desta bactéria, devido à frequente ocorrência de infecções causadas pela mesma como, por exemplo, as mastites, que favorecem a contaminação do leite e de seus derivados (SERIDAN et al., 2012). Os alimentos podem se contaminar em diferentes etapas da produção, principalmente aqueles que são altamente manipulados, como o queijo (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO et al., 2010; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

O consumo *per capita* de queijo apresenta destaque na população brasileira com cerca de cinco kg ao ano (ABIQ, 2014). Dentre os diferentes tipos de queijos produzidos no país, o consumo de queijo fresco é o principal (CHALITA et al., 2009). O queijo do tipo Minas fresco possui alta suscetibilidade a alterações microbiológicas e proteolíticas, pois apresenta alto teor de umidade e manipulação, sendo necessário rigoroso controle na fabricação e comercialização (LOGUERCIO; ALEIXO, 2004).

Os queijos produzidos industrialmente possuem legislação vigente estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e devem ser produzidos a partir de leite pasteurizado (DORIGON, 2010). Por outro lado, este alimento também é fabricado e comercializado em setor informal, a partir de leite cru, em condições de higiene insatisfatórias, isento de regulamentação e fiscalização. Por esses motivos, está envolvido com transmissão de bactérias patogênicas e é apontado como um dos alimentos que tem sido frequentemente responsabilizado pela intoxicação alimentar estafilocócica (DORIGON, 2010; LOGUERCIO; ALEIXO, 2004).

Muitas bactérias provenientes de alimentos de origem animal, além do alto potencial patogênico, podem apresentar resistência a agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de diversas doenças (GHOSH; LAPARA, 2007; HAMMERUM; HEUER, 2009). Já foi relatada na literatura a ocorrência de cepas de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos, portadores de genes que codificam enterotoxinas em seres humanos, o que torna os alimentos manipulados possíveis veiculadores desse micro-organismo e dificulta o tratamento da doença em razão dos mecanismos de resistência (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

Os parâmetros que definem as características microbiológicas de um alimento, caracterizados pela presença de micro-organismos em quantidades permitidas ou sua ausência, estabelecidos pela legislação, são essenciais para determinar a qualidade

e a segurança deste, e podem fornecer informações relevantes relacionadas à produção, à qualidade higiênicossanitária e aos possíveis riscos à saúde. A avaliação destes critérios permite classificar o produto como adequado ou não para o consumo e diferenciar processos e práticas de manipulação (FOSHEIM et al., 2011).

No diagnóstico microbiológico, a aplicação de técnicas de biologia molecular colabora com as metodologias fenotípicas e através da análise do DNA dos micro-organismos é possível detectar com maior precisão a proximidade entre cepas específicas e os eventos clínicos ou epidemiológicos relacionados, assim como identificar os genes responsáveis pelos fatores de virulência. A aplicação destas técnicas favorece a diminuição de erros na identificação, no tratamento e na erradicação de patógenos, que é indispensável para efetivação da terapia antimicrobiana e propicia maior segurança ao consumidor (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Sendo assim, observa-se a importância de identificar o nível contaminação por *S. aureus* em um produto amplamente consumido como o queijo Minas frescal, assim como conhecer o perfil molecular da bactéria o que permite auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes, que estabeleçam normas mais rigorosas em toda cadeia produtiva e que garanta um alimento adequado dentro das normas vigentes e seguro para o consumo humano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJO MINAS FRESCAL

A produção de queijo no Brasil teve início em Minas Gerais no século XVIII, sob influência de imigrantes europeus, com surgimento da produção industrial em 1888, na Zona da Mantiqueira - MG e alcance do desenvolvimento industrial em grande escala na década de 1930 (PERRY, 2004). Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque em todos os segmentos da cadeia produtiva de queijos em nível mundial. Detém o terceiro maior rebanho de gado leiteiro e é o terceiro maior produtor de queijos do mundo, setor que movimenta um terço do mercado do leite com crescente aumento anual na produção formal e informal (ABIQ, 2014).

No Brasil, entre os anos de 2005 e 2013 observou-se um avanço de 76% no consumo *per capita* de queijos, o que representa crescimento anual de 8% a 9%. Pelas estimativas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o consumo per capita de queijos no país deverá alcançar 11 quilos em 2030 (ABIQ, 2014).

Dentre as diferentes variedades de queijos produzidos no Brasil, o queijo do tipo Minas frescal é o terceiro mais fabricado no país e um dos mais populares, fazendo parte da cultura e da alimentação diária em muitas regiões (ABIQ, 2011). A popularidade desse queijo é justificada pela tradição cultural, hábito alimentar, baixo custo, processamento simples, retorno rápido do investimento, ausência de maturação e bom rendimento na fabricação (VINHA et al., 2010).

O queijo Minas frescal é um queijo branco, produzido a partir de leite pasteurizado, após coagulação com coalho enzimático ou químico e remoção do soro, modelagem de forma manual e salga (ARAÚJO et al., 2002). Segundo a legislação, é classificado como um produto fresco, de alta umidade (de 55 a 60%), semi-gordo (38 a 47% de gordura no extrato seco), que deve ser mantido em temperaturas abaixo de 8° C (BRASIL, 1996). Apresenta alta atividade de água, baixo pH (5,1 – 5,6) e 1% a 6% de cloreto de sódio. Devido a estas características, é um produto que apresenta vida de prateleira curta, de sete a 10 dias e requer cuidados rigorosos de refrigeração durante sua cadeia de comercialização (FREITAS, 1993; GONZALEZ, 2000).

O queijo do tipo Minas frescal industrializado, deve atender aos requisitos de qualidade e identidade preconizados pela Portaria nº 146 do MAPA, produzido a partir de leite pasteurizado, em indústria laticinista, com serviço de inspeção (BRASIL, 1996). Já o queijo Minas produzido em setor informal, é caracterizado por não atender aos processos de produção, regulamentação e fiscalização e é normalmente produzido a partir do leite cru, comercializado em feiras livres ou de forma autônoma, o que põe em risco a qualidade e segurança do alimento (DORIGON, 2010). Esse fato, associado a vários outros fatores como o alto teor de umidade, torna o queijo susceptível a alterações proteolíticas e microbiológicas. O baixo pH; a matéria-prima de origem animal; a contaminação pós-pasteurização; o processamento e manipulação; os equipamentos; temperaturas inadequadas durante o transporte, estocagem e comercialização, contribuem para que o queijo se torne um ambiente favorável para a contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana. Muitas dessas bactérias podem ser patogênicas ou produzir metabólitos microbianos, como por exemplo, o *S. aureus*, o que causa intoxicação ou infecção alimentar nos seres humanos (LOGUERCIO; ALEIXO, 2004; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006).

Vários autores têm demonstrado contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal no Brasil (ANDRÉ et al., 2006; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; SANTOS; HOFFMANN, 2010; PINTO et al., 2011). André et al. (2006) ao analisar queijo minas frescal no estado de Goiás obteve 20 isolados de *S. aureus* de 17 (70,8%) das 24 amostras, com média de contagem de $3,8 \times 10^4$ Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g), sendo 13 (54,2%) com contagens acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (10^3 UFC/g).

É essencial, portanto, o conhecimento das características sensoriais, químicas e microbiológicas de um produto amplamente consumido como o queijo Minas frescal, já que o melhoramento da qualidade é uma forma de agregar valor nutricional e de segurança ao alimento (PIAZZON-GOMES, 2010).

O padrão microbiológico é um critério obrigatório, que deve reprovar aqueles alimentos que não estiverem de acordo com a legislação ou regulamentação administrativa. O cuidado na fabricação de alimentos de origem animal, altamente manipulados, como o queijo Minas frescal, deve ser rigoroso e seguir as recomendações vigentes. A produção desse tipo de alimento deve ser inspecionada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), que é um sistema de controle do MAPA, que objetiva avaliar a qualidade da produção e verificar se o produto atende aos requisitos

mínimos de qualidade estabelecidos dentro do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (FRANCO, 2004).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos vigente no momento. A RDC preconiza que para queijos de alta umidade, incluindo o queijo Minas frescal, devem ser realizadas as contagens de Coliformes a 45 °C, com tolerância de 5×10^2 UFC/g; Estafilococos coagulase-positiva (5×10^2 UFC/g); pesquisa de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes* (ausência em 25 g de amostra indicativa) (BRASIL, 2001). A pesquisa desses micro-organismos determinará se o produto está adequado, do ponto de vista higienicossanitário e de saúde pública, de acordo com os diferentes graus de riscos oferecidos por tais micro-organismos (FRANCO, 2004).

2.2 ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

O gênero *Staphylococcus* é constituído de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, imóveis, não esporuladas, não capsuladas ou com limitada capacidade de formação de cápsula. Apresentam-se, microscopicamente, sob o agrupamento de “cachos de uva”, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm. Podem também ser encontrados isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, dependendo da idade da colônia (WINN et al., 2006).

São micro-organismos produtores das enzimas catalase, coagulase, termonuclease e hemolisinas. A maioria das espécies é anaeróbia facultativa com genoma de aproximadamente 2.000 a 3.000 kb (KLUYTMANS, 2010; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

Os estafilococos possuem versatilidade nutricional e apresentam capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes condições ambientais por um longo período de tempo (LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003). Multiplicam-se em alimentos com Aa baixa (0,86), pH entre 4,2 e 9,3 e em alimentos com uma concentração de cloreto de sódio de até 15%. Sob temperatura ótima de crescimento, entre sete e 46 °C são capazes de produzir enzimas e exotoxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas (EE) (JORDA et al., 2012).

Normalmente, os *Staphylococcus* e seus hospedeiros apresentam relação simbiótica, porém estas bactérias podem se comportar como patogênicas caso as barreiras cutâneas e mucosas sejam rompidas. São predominantemente encontrados na pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves. Podem ser encontrados também na boca, sangue, glândulas mamárias, trato gastrointestinal, urinário e respiratório (WINN et al., 2006). Apesar de várias espécies serem capazes de habitar diferentes regiões do corpo, o *S. aureus* é um dos principais patógenos da espécie humana (KLUYTMANS, 2010).

Atualmente, o gênero é composto de 51 espécies e 28 subespécies pertencentes à família *Staphylococcaceae* (DSMZ, 2015). A maioria não produz a enzima coagulase. A exclusividade da síntese caracteriza as espécies coagulase positiva: *S. aureus*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003). Algumas dessas espécies são frequentemente associadas a diferentes infecções de caráter oportunista, tanto em humanos como em animais (JAY, 2005; WINN et al., 2006).

No homem, podem surgir desde infecções benignas na pele (foliculite, impetigo e furúnculo) até doenças sistêmicas capazes de levar à morte (bacteremia, septicemia) (CHAPAVAL et al., 2008; WINN et al., 2006). Além do mais, quando as EE são produzidas no alimento e ingeridas pelo homem, causam sintomas diversos como: dor de cabeça, náuseas, vômitos, cólica abdominal e prostração (LAMAITA et al., 2005).

Normalmente é detectada a presença de *Staphylococcus spp.* em grande parte dos alimentos de origem animal, manipulados e sem tratamento térmico adequado. As espécies de maior importância em alimentos são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius*, sendo que o *S. aureus* é o mais comumente envolvido em surtos de intoxicação alimentar, devido à maior produção de EE. Pode ser transmitido aos alimentos através da matéria prima, do ambiente de processamento ou durante o preparo e manipulação, transporte, armazenamento e distribuição, favorecendo a multiplicação microbiana com consequente produção de enterotoxina (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; SALOTTI et al., 2006).

O *S. aureus* possui importante papel como patógeno humano já que dispõe de um conjunto amplo de mecanismos de virulência (WINN et al., 2006).

Trata-se de um micro-organismo ubíquo, com capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes variedades de ambientes por um longo período de tempo, tornando sua presença na natureza amplamente distribuída (KLUYTMANS, 2010; WINN et al., 2006). É uma bactéria mesófila, com temperatura de crescimento entre sete e 48°C, com ótima de 37°C. Produz enterotoxina entre 10 e 48°C, sendo a temperatura ótima de 40 a 45°C. Multiplica-se em pH entre 4,2 e 9,8, com faixa ótima entre 6,0 a 7,0, em alimentos com atividade de água inferior à 0,86 e em concentrações de cloreto de sódio de 7 a 10%, podendo ser, em algumas linhagens de até 20% (WINN et al., 2006).

O ser humano constitui um reservatório natural do *S. aureus*, sendo que cerca de 20% a 50% da população é portadora da bactéria (LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003). Pode ser encontrada em diversas partes do corpo humano, como no trato respiratório, principalmente nas cavidades nasais - consideradas nichos ecológicos naturais de *S. aureus* -, na pele, no trato intestinal, nos pelos e na boca (FERREIRA et al., 2010; KLUYTMANS, 2010).

Outros animais também podem apresentar-se como portadores ou contaminados pela bactéria, como por exemplo, os bovinos, que podem desenvolver mastite estafilocócica clínica, subclínica ou latente e produzirem leite contaminado. Além disso, a contaminação ambiental durante a ordenha ou processamento do leite, torna este produto um dos principais alimentos veiculadores desta bactéria, e conseqüentemente, seus derivados, como os queijos (FERREIRA et al., 2010; KLUYTMANS, 2010; SERIDAN et al., 2012).

2.2.1 Fatores de virulência

O potencial patogênico de *S. aureus* relaciona-se com a capacidade de produção de moléculas como enzimas e toxinas que contribuem para sua habilidade em colonizar e causar doenças em mamíferos (HAVERI et al., 2007).

Algumas linhagens podem formar uma cápsula de natureza polissacarídica, o que contribui para impedir a fagocitose do micro-organismo por células de defesa. Podem produzir e secretar proteína A, que apresenta alta afinidade pela região Fc das moléculas de IgG e dificulta a ação do sistema imunológico (KONEMAN et al., 2008).

Dentre as enzimas produzidas pela bactéria, destacam-se a catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio; a termonuclease (Tnase) responsável pela degradação do DNA e RNA em fosfomononucleosídeos e a

coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência à opsonização e à fagocitose (KONEMAN et al., 2008).

A produção da enzima coagulase é o principal critério usado pela microbiologia clínica para a identificação de *S. aureus* isolados de infecções humanas. Apesar de dados conflitantes a respeito da importância da coagulase como um fator de virulência, esta é apontada como a primeira linha de defesa do *S. aureus* (MARTINEZ et al., 2001). Segundo Bergdoll (1990), se um isolado apresenta resultados positivos para a produção das enzimas coagulase e termonuclease, pode ser considerado como potencialmente produtor de enterotoxinas.

A maioria das cepas secreta enzimas e citotoxinas como nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e collagenase e quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta). Alguns tipos de alfa e beta hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, e degradam tecidos (NAGASE et al., 2002; ZSCHOCK et al., 2005).

Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas como a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1). A PVL é uma leucotoxina formadora de poros nas membranas principalmente de leucócitos e macrófagos, associada com infecções de pele e tecidos como lesões epidérmicas necróticas, furúnculos e osteomielites (VON EIFF et al., 2004) e ainda com pneumonia necrotizante hemorrágica (GILLET et al., 2002). A TSST-1 é uma toxina que provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa. Se não tratada adequada e imediatamente, um choque letal pode se desenvolver dentro de 24 horas após o início dos sintomas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; NAGASE et al., 2002; ZSCHOCK et al., 2005).

Alguns isolados produzem também as chamadas toxinas esfoliativas (*Exfoliative toxins* - ET) que promovem a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas. As duas principais isoformas ET de *S. aureus*, ETA e ETB, biológica e sorologicamente distintas, são primariamente responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada ou doença de Ritter e impetigo bolhoso em humanos (NAGASE et al., 2002; ZSCHOCK et al., 2005).

As infecções estafilocócicas portanto, dependem de diferentes fatores de virulência, porém, a intoxicação alimentar estafilocócica depende apenas da produção de enterotoxinas (LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

2.2.1.1 Enterotoxinas

As EE, agentes de intoxicação alimentar, são potentes exotoxinas produzidas por espécies de *Staphylococcus* durante a fase pós-exponencial de crescimento bacteriano (FRANCO; LANDGRAF, 2008). São proteínas simples de baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons) e de cadeias curtas (em média 250 aminoácidos) (LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

Uma variedade de EE já foi descrita pela literatura. São definidas como capazes de causar intoxicação alimentar estafilocócica com atividade emética e incluem as EE A, B C, D, E, G, H, I, R e T. Também são descritas as EE/ (SE/ toxins – *Staphylococcal enterotoxins like toxins*) que incluem as EE/ J, K, L, M, N, O, P, Q, S, U, V e X, que apresentam estruturas similares às EE, e são caracterizadas por não induzirem emese em seres humanos. Entretanto, recentemente foi detectado em estudo evidências adicionais de que estas enterotoxinas sejam capazes de causar intoxicação alimentar estafilocócica em seres humanos (XU; MC CORMICK, 2012).

S. aureus pode produzir uma ou mais EE simultaneamente (SMYTH et al., 2006; ZOCHE et al., 2009) e apesar de produzir uma grande variedade de enterotoxinas, as clássicas (EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED e EEE) apresentam maior ocorrência em casos e surtos de intoxicação alimentar (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

A maioria das intoxicações alimentares é proveniente principalmente da ingestão de EEA e EED (AL-TARAZI; ALBETAR; ALABOUDI, 2009, JOHLER; STEPHAN, 2010; WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Já nos casos de mastite estafilocócica, a enterotoxina mais comum é a EEC (ZOLI; NEGRETE; OLIVEIRA, 2002).

As EE são altamente estáveis, resistentes ao calor e à inativação pelas proteases gastrointestinais como a pepsina e a tripsina, o que possibilita sua integridade na passagem pelo trato gastrointestinal. A estabilidade ao calor é uma das propriedades mais importantes em termos de segurança alimentar, pois não perdem sua atividade por métodos de cocção padrão (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Embora a pasteurização inative as células de *S. aureus*, geralmente a atividade biológica das enterotoxinas é conservada (BERGDOLL, 1990; ASAO et al., 2003). Podem estar presentes em alimentos mesmo na ausência da bactéria, já que resistem às condições ambientais que destroem facilmente as bactérias produtoras (LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

As EE apresentam estrutura molecular e atividade farmacológica semelhantes entre si, porém apresentam propriedades imunológicas distintas (BALABAN e RASOOLY, 2000). Possuem proximidade genética entre si e sua relação filogenética é estimada pela análise da sequência de nucleotídeos de seus respectivos genes (BALABAN e RASOOLY, 2000), que são carregados por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos e os bacteriófagos ou por elementos genéticos heterólogos, que são as ilhas de patogenicidade (MARTÍN et al., 2004). As enterotoxinas EEA e EED, mais comuns em surtos de DTA, são codificadas respectivamente por genes localizados em bacteriófago e plasmídeo (MARTÍN et al., 2004).

A presença de genes para fatores de virulência em elementos genéticos móveis possibilita o processo de transferência horizontal de genes através da mobilidade de uma molécula de DNA para outra ou de uma bactéria para outra, o que gera vantagem seletiva e evolutiva ao micro-organismo receptor (FERREIRA, 2001).

A secreção das EE é do tipo cepa-específica, embora uma mesma cepa de *S. aureus* possa conter diversos genes destas proteínas (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012; PAULIN; HORN; HUDSON, 2012). A regulação dos fatores de virulência é de extrema importância para determinação da patogenicidade do micro-organismo.

Em *S. aureus*, pelo menos quatro sistemas regulatórios influenciam a produção das enterotoxinas. O mais citado é o gene acessório regulador (*agr*), que atua juntamente com o gene acessório regulador estafilocócico (*sar*). O sistema *agr* regula a produção de algumas EE como as EEB, EEC e EED. Já a EEA é expressa de maneira peculiar e, até o momento, não se conhece mecanismos de regulação responsáveis pela produção desta toxina (JOHLER; STEPHAN, 2010; LE LOIR; BARON; GAUTIR, 2003).

O consumo de alimentos contaminados com enterotoxinas produzidas por *S. aureus*, dependendo da suscetibilidade individual e da dose tóxica ingerida, proporciona o estabelecimento do quadro de intoxicação alimentar estafilocócica, sendo que a contagem de *S. aureus* deve ser de 10^5 a 10^6 UFC/g de alimento para produzir enterotoxina em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008; PELISSER et al., 2009).

Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, dores de cabeça e queda de pressão e, em casos mais graves, a hipotermia e a síndrome do choque tóxico. Alguns dos sintomas relacionados surgem cerca de uma

a seis horas após a ingestão de alimentos contaminados e desaparecem entre 24 e 48 horas (CHAPAVAL et al., 2008; JAY, 2005; LAMAITA et al., 2005; NORMANNO et al., 2005). Embora as mortes relacionadas à essa intoxicação sejam raras, podem ocorrer em indivíduos imunossuprimidos e em grupos de maior vulnerabilidade como idosos e crianças (NORMANNO et al., 2005).

Todas as categorias de toxinas são conhecidas por influenciar células do sistema imune principalmente com o objetivo de impedir a resposta imune do hospedeiro. São classificadas como superantígenos por induzir a resposta imune policlonal pela ligação direta no Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II nos receptores de células T, sem ser internalizadas e processadas como um antígeno normal, o que provoca a proliferação de células T e citocinas (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; JAY, 2005; SILVA; SAUER; KOLAR, 2009).

A quantidade de EE necessária para ativação de células T é bem menor que a requerida para resposta ao antígeno convencional, sendo que a quantidade de citocinas produzida é consideravelmente maior na resposta às EE. Os sintomas náuseas e vômitos presentes na intoxicação alimentar estafilocócica são atribuídos à grande quantidade de interleucina liberada após a ativação das células T (PROFT; FRASER, 2003).

O mecanismo molecular que induz a emese não está totalmente esclarecido, porém, sabe-se que o alvo das enterotoxinas responsáveis pelo início do reflexo do vômito está localizado nas vísceras abdominais que possuem receptores para as mesmas. A resposta emética às enterotoxinas é dependente da ativação do centro medular do vômito no cérebro, que é estimulado por impulsos transmitidos pelo nervo vago e nervos simpáticos. (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; MARTÍN et al, 2004).

A severidade da intoxicação alimentar estafilocócica depende tanto da enterotoxina envolvida, quanto da quantidade de EE ingerida com o alimento (PROFT; FRASER, 2003). A intoxicação causada por EEB, por exemplo, causa sintomas mais severos com menor quantidade da toxina quando comparada às intoxicações por EEA (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O diagnóstico da intoxicação alimentar estafilocócica é feito com base nos sintomas clínicos e também pela detecção de enterotoxinas nos alimentos ingeridos. O período curto de incubação é fator que caracteriza a intoxicação, porém, que

dificulta a identificação da condição, desfavorecendo a vigilância epidemiológica, uma vez que não há frequência esperada de casos notificados, podendo explicar as alterações e a aparente baixa na prevalência de intoxicações alimentares envolvendo *S. aureus* (SERIDAN et al., 2012).

Os alimentos manipulados após o cozimento são mais suscetíveis a contaminação estafilocócica como, por exemplo, carnes, cremes, maionese, saladas e queijos, sendo esse último, um alimento altamente relacionado aos casos de intoxicação alimentar, e o *S. aureus* o mais importante micro-organismo responsável pelas contaminações do queijo Minas frescal (ROCHA; BURITI; SAAD, 2006).

Vários casos e surtos já foram mencionados na literatura. Os alimentos mais frequentes na intoxicação alimentar estafilocócica diferem de um país para outro, devido a diferenças no consumo e hábitos alimentares de cada local. Ostyn et al. (2010), relataram a primeira evidência de intoxicação alimentar causada pela EEE na França, após ingestão de queijo fabricado com leite não pasteurizado. Jørgensen et al. (2005), após um surto de intoxicação alimentar estafilocócica na Noruega, encontraram EEH em um purê de batatas preparado com leite cru. Giezendanner et al. (2009), descreveram um surto ocorrido com crianças na Suíça, após consumo de leite de cabra cru, e detectaram a presença do gene da EED.

A mesma amostra de alimento pode conter diferentes enterotoxinas, uma vez que podem estar presentes diferentes isolados de *S. aureus*. Sendo assim, é importante avaliar vários isolados a partir das placas de cultivo, principalmente nos casos em que sintomas típicos de intoxicação estafilocócica são observados (JØRGENSEN et al., 2005). A detecção dos genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas também se torna relevante para auxiliar no levantamento do número de casos de surtos de doenças alimentares e na análise de risco para gastroenterite de origem alimentar (ZOCHE; BASTOS; SILVA, 2010).

2.2.1.2 Resistência aos antimicrobianos

A terapia antimicrobiana é utilizada no tratamento das infecções, porém há uma elevada e crescente prevalência de resistência aos antibióticos utilizados. O desenvolvimento de testes simples e de rápido diagnóstico, capazes de identificar espécies de *Staphylococcus* e determinar o perfil de resistência, torna-se uma alternativa de suma importância para o progresso no diagnóstico das infecções (NORMANNO et al., 2005).

O surgimento de cepas multirresistentes nas últimas décadas está relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos, devido a seu uso intensivo na medicina humana (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). O uso inadequado e indiscriminado de antibióticos leva a falhas que não garantem o sucesso terapêutico e, conseqüentemente, provoca a ineficácia de muitos deles. Muitas vezes, as normas para o uso adequado, como o conhecimento da sensibilidade dos micro-organismos frente aos seus principais grupos, não são seguidas (CHA; VAKULENKO; MOBASHERY, 2007; KARAHAN; AÇIK; CETINKAYA, 2009).

O setor agrícola é um dos setores que fazem o uso da terapia antimicrobiana em demasia, tanto para fins terapêuticos, com foco no tratamento de mastites bovinas, como para suplementação dietética incorporada à alimentação animal. Esta conduta propicia o aumento de resíduos de antibióticos no leite, que podem favorecer a seleção de cepas resistentes neste alimento e em seus derivados (CHA; VAKULENKO; MOBASHERY, 2007; KARAHAN; AÇIK; CETINKAYA, 2009).

Bactérias provenientes de alimentos de origem animal apresentam com frequência resistência a diversos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças. O *S. aureus* é um patógeno de genoma variável, com capacidade de adaptar-se à terapia antimicrobiana, o que o caracteriza como um micro-organismo com tendência a resistência aos antimicrobianos (ARAÚJO; GALDINO; AMARAL, 2011; DELSOL et al., 2010; GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2004).

A resistência ao tratamento com antibióticos foi observada desde a introdução de antibióticos na prática clínica (HIRAMATSU et al., 2001). Na década de 1940 foram identificadas as primeiras cepas de *S. aureus* produtoras de penicilinase (resistentes à penicilina) pouco tempo após a prescrição do antibiótico, droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas (WINN et al., 2006).

Nos anos 1960, foi sintetizada a penicilina resistente à penicilinase (beta-lactamase), precursora do grupo da meticilina e da cefoxitina. Nesta mesma década, foram identificadas as primeiras cepas resistentes a este medicamento, tornando-se um problema preocupante em saúde pública. A partir de então, ocorreu um aumento mundial de cepas resistentes, conhecidas como *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), caracterizadas por apresentar uma proteína ligadora de penicilina (PBP) alterada (PBP2a), codificada pelo gene *mecA* e situada na superfície externa da parede celular, possuindo baixa

afinidade aos antibióticos β -lactâmicos, o que resulta em resistência cruzada a múltiplos agentes antimicrobianos (ARAÚJO; GALDINO; AMARAL, 2011).

A presença desse patógeno é bastante conhecida em ambientes hospitalares, porém, já foi observado envolvimento em surtos de origem alimentar e isolamento em diferentes alimentos, podendo a via alimentar ser um meio de disseminação desta cepa (JONES et al., 2002; KLEVENS et al., 2007). Está geralmente envolvido em casos de infecção de pele, porém pode provocar doenças invasivas e graves (KLEVENS et al., 2007).

O controle destas cepas ainda é desafiante tanto em âmbito hospitalar quanto comunitário. Diante de relatos de cepas MRSA portadoras de genes que codificam enterotoxinas encontradas em seres humanos, a veiculação destes micro-organismos por alimentos, principalmente os manipulados, se torna bastante relevante, assim como a seleção de medicamentos apropriados para o tratamento (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

Devido à complexidade dos mecanismos de resistência, a escolha da droga adequada para o tratamento de doenças não é uma tarefa fácil. O teste de suscetibilidade avalia a resistência dos micro-organismos contra diferentes agentes antimicrobianos, e seus resultados influenciam na escolha terapêutica antimicrobiana adequada (CLSI, 2014).

2.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Segundo a *World Health Organization* (WHO) as DTA, definidas como doenças infecciosas ou tóxicas causadas por agentes que entram no organismo humano por meio de água e alimentos contaminados, continuam sendo uma das causas relevantes de mortalidade no mundo, apesar dos avanços industriais e de controle de qualidade (WHO, 2013a).

Vários fatores contribuem para que a ocorrência desta patologia seja crescente em âmbito mundial como o avanço da urbanização, o crescimento populacional, o aumento do consumo de refeições fora de casa, a existência de grupos populacionais mais expostos, a deficiência dos órgãos públicos e privados no controle de qualidade de alimentos e as adaptações microbianas, que podem levar à emergência de novos

fatores de virulência e de patógenos resistentes a antimicrobianos, o que pode dificultar o tratamento (ÁVILA et al., 2010).

Os alimentos, tanto *in natura* quanto processados, são altamente suscetíveis à contaminação microbiológica uma vez que os micro-organismos são amplamente encontrados no ambiente, nos vegetais, nos animais e no homem. A contaminação provoca consequências variadas que podem ser expressas através de pequenas alterações do produto, como provocar intoxicações graves no consumidor (CDC, 2011; NDDIC, 2012). As consequências à saúde podem variar de acordo com sua natureza, o estágio de tratamento, da suscetibilidade do indivíduo, da idade, da patogenicidade do agente e da quantidade de micro-organismos ingeridos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Estima-se que anualmente nos Estados Unidos (EUA), os patógenos causadores de doenças sejam responsáveis por cerca de 9,4 milhões de DTA, das quais 3,6 milhões são causadas por bactérias, o que gera mais de 35 mil hospitalizações e cerca de 900 mortes (SCALLAN et al., 2011).

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2013, a vigilância epidemiológica registrou que dentre os micro-organismos patogênicos, os de maior destaque epidemiológico nas ocorrências de DTA no país foram as bactérias, identificadas em 38,0% dos surtos de DTA. Os agentes etiológicos mais associados foram *Salmonella spp.* (39,4%), *S. aureus* (19,7%), *E. coli* (12,4%), *B. cereus* (7,6%), vírus da Hepatite A (6,1%) e Rotavírus (5,0%). Entre os alimentos mais envolvidos estão os ovos e produtos a base de ovos (16,5%); água (10,1%); doces e sobremesas (9,0%); carne bovina processada e miúdos (7,1%) e leite e derivados (6,9%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No Brasil, há relatos de intoxicação alimentar estafilocócica, como os dois surtos de DTA ocorridos em Minas Gerais que envolveram queijo Minas frescal, no qual identificou-se as enterotoxinas EEA, EEB e EEC, e leite cru, onde se identificou EEC e EED (CARMO et al., 2002). Veras et al. (2003), investigaram surtos de intoxicação alimentar envolvendo leite e seus derivados no estado de Minas Gerais, e constataram que os principais agentes causadores foram *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa enterotoxigênicos, sendo EEA, EEB e EEC as principais toxinas envolvidas nos surtos.

Apesar da relação positiva entre as doenças de origem alimentar com a ingestão de água e alimentos contaminados, a precariedade de informações e a falta

de notificações imediatas comprometem a real dimensão do problema (WELKER, et al., 2010). No Brasil, os surtos de DTA notificados, em geral, restringem-se àqueles que englobam um maior número de pessoas ou quando os sintomas da doença são prolongados. Estas situações não geram apenas prejuízos diretos para os doentes, mas também acarretam prejuízos com perda da produção, saúde coletiva e recursos hospitalares (SPRICIGO et al., 2008).

Os sistemas de notificação têm evoluído e se modernizado, no entanto, os surtos de DTA envolvendo alimentos contaminados são em quase todos os países, sub-notificados. A notificação dos surtos é tardia, o que leva à ausência de coleta das amostras em tempo oportuno e diminui a eficácia dos resultados laboratoriais (WELKER, et al., 2010).

A incidência de surtos de doenças alimentares requer investigações cuidadosas quanto: à história dos alimentos veiculadores de doenças, condições ambientais das áreas de produção e de preparo, identificação do agente etiológico, condições de saúde dos manipuladores de alimentos, condições de transporte de animais vivos e gêneros alimentícios, dentre outras (WELKER et al., 2010).

A prevenção dessas doenças depende da execução adequada de procedimentos durante as etapas de produção até a venda do produto final, levando em consideração fatores primordiais para a garantia de um alimento seguro para o consumo, como a higiene e o binômio tempo-temperatura. O conhecimento nas áreas de microbiologia, genética microbiana e higiene dos alimentos é fundamental para detecção das causas e origens das contaminações, assim como para a redução de seus riscos (WHO, 2013b).

2.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA

A caracterização ou tipificação de isolados microbianos é importante no estudo epidemiológico e podem ser aplicadas na identificação do patógeno e detecção da fonte de infecção. Avalia-se também as relações biológicas, os mecanismos de transmissão, os genes de virulência, antigenicidade e resistência a drogas (LEVIN; LIPSITCH; BONHOEFFER, 1999).

As técnicas de tipificação são específicas e podem ser baseadas em parâmetros fenotípicos e genotípicos das bactérias. Os procedimentos

fundamentados no fenótipo são aqueles que diferenciam as cepas através da caracterização dos produtos da expressão gênica, como por exemplo, a presença de antígenos na superfície celular e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (TENOVER et al., 1997). Já os métodos que utilizam o padrão genético, são baseados na análise da estrutura genética do micro-organismo em que se utilizam enzimas de restrição, amplificação de ácido nucleico ou sequenciamento de nucleotídeos (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009; YAN et al., 2003).

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos ou antibiograma além de orientar o tratamento clínico das infecções também pode ser usado como uma das técnicas de tipificação microbiana fenotípica. A tipificação por antibiograma pode, com uma relevante seleção de marcadores, ser aplicada à maioria das espécies microbianas (STRUELENS, 1996). Tem sido rotineiramente utilizado para comparar cepas de *S. aureus*, identificar mecanismos de transmissão e fontes de contaminação, principalmente por ser um método que apresenta ampla disponibilidade, rigoroso controle de qualidade, baixo custo, fácil execução e contribuição para o conhecimento sobre a resistência dos microrganismos a antimicrobianos (ARBEIT, 1999).

Em estudos epidemiológicos detalhados, o antibiograma apresenta limitações de uso devido à variação fenotípica, que diminui o poder discriminatório já que a resistência antimicrobiana está sob pressão seletiva dentro dos hospitais e outros centros de tratamento. Além disso, existem vários mecanismos genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana, como mutações pontuais e aquisição de genes de resistência mediados por elementos genéticos móveis. Consequentemente, cepas diferentes podem apresentar perfis de resistência semelhantes e a mesma cepa pode apresentar diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos pela aquisição de novo material genético, com o tempo ou com perda de plasmídeo (ARBEIT, 1999; TENOVER et al. 1997).

O uso das técnicas de biologia molecular contribui para detectar associações de maneira mais confiável, além de sedimentar e refinar dados, o que garante classificações mais sensíveis e específicas (FOXMAN; RILEY 2001). Os resultados obtidos através do uso da biologia molecular colaboram com a epidemiologia molecular, pois facilitam as atividades epidemiológicas, como vigilância, investigações de surtos de DTA, identificação de modelos de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente desconexos, caracterizando interações hospedeiro-patógeno, o que gera melhor entendimento da patogênese das doenças em nível molecular

(FOXMAN; RILEY 2001). Porém nenhuma das técnicas conhecidas combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade, além de serem complexas para interpretação de resultados e aplicação efetiva nos estudos epidemiológicos (ARBEIT, 1999).

A adequada identificação do patógeno é um requisito indispensável para detecção da fonte de infecção. A epidemiologia microbiana é útil, pois permite conhecer o perfil dos isolados, entender as relações genéticas entre diferentes clones, assim como detectar o fluxo gênico e traçar as estratégias de sobrevivência e virulência de micro-organismos patogênicos ou multirresistentes como parte de sistemas de vigilância (ARBEIT, 1999; VAN BELKUM et al. 2001).

As diferentes populações de *S. aureus* apresentam variabilidade do conteúdo genômico, o que torna necessária a identificação dos isolados antes de se aplicar medidas para controle dessa bactéria (FITZGERALD et al., 2003). A combinação de métodos de tipificação fenotípicos e genotípicos é a melhor forma para compreensão da epidemiologia da intoxicação alimentar estafilocócica (SHIMIZU et al., 2000)

2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase - *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e suas variações são técnicas altamente sensíveis que, por meio de pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicos, enzimaticamente amplificados, conseguem obter milhões de cópias da sequência alvo e permite uma série de modificações que possibilita seu uso na análise de diferentes tipos de amostras (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Foi desenvolvida por Kary Mullis em 1985, o que permitiu recriar grande quantidade de um gene a partir de uma parte ínfima de DNA (WERB, 1999). É uma técnica que possui alta sensibilidade e especificidade, capaz de produzir bilhões de cópias de um segmento específico do DNA em algumas horas. A PCR é realizada por um equipamento automatizado, denominado termociclador, que possibilita a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (WINN et al., 2006).

A amplificação específica de sequências de ácidos nucleicos através da PCR tem sido empregada no diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas e diversos estudos utilizam a PCR para detecção de diferentes tipos de micro-organismos em alimentos (BLAIOTTA et al., 2004; CHEN; CHIOU; TSEN, 2004; GANDRA, 2003). A

identificação de *S. aureus* em alimentos de origem animal pode ser feita através desta técnica e possui resultados relevantes na avaliação epidemiológica de casos e surtos de intoxicação estafilocócica, já que possibilita determinar o tipo de EE e os genes produtores das mesmas (ZOCCHÉ et al., 2009).

2.4.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE)

A macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) tem se mostrado como marcador epidemiológico mais confiável para tipificação de *S. aureus*, por ser um método altamente discriminatório, estável e reprodutível (SHIMIZU et al., 2000).

Desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984), é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao seu tamanho. Trata-se de uma variação da eletroforese em gel de agarose, na qual o campo elétrico varia periodicamente, ou seja, é pulsado. Consiste na digestão do cromossomo por endonucleases de restrição específicas como a *Sma*I para *S. aureus*, que irá gerar perfis de fragmentos de DNA. A eletroforese destes fragmentos permite visualizar o perfil de restrição, que, através de suas similaridades, possibilita estabelecer a relação entre os isolados bacterianos (ARBEIT, 1999; SINGER; SISCHO; CARPENTER, 2004).

Apesar de possuir limitações como tempo gasto na execução, custo e necessidade de equipamento eletroforético e softwares especializados e caros, a interpretação dos resultados é simples e guias já foram publicados com a correlação das variações dos perfis de restrição com as questões epidemiológicas (SENNA et al., 2002; TENOVER et al., 1995).

A técnica de PFGE tem sido utilizada com sucesso para tipificação de um grande número de organismos Gram-negativos, Gram-positivos e espécies de micobactérias (BLANC et al., 2001) com resultados favoráveis para determinação da fonte bacteriana em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica e em investigações epidemiológicas e genéticas. É utilizada com diferentes propósitos genéticos e epidemiológicos e permite comparar e classificar isolados, estimar o tamanho do genoma de cada cepa e analisar a relação genética entre essas cepas (MARTÍN et al., 2004).

Tendo em vista que o queijo Minas frescal é um produto amplamente consumido no Estado de Goiás sendo produzido e comercializado tanto de maneira formal, quanto informal e estando frequentemente associado a surtos de intoxicação estafilocócica, este estudo foi proposto a fim de avaliar o nível de contaminação de um produto tão popular e verificar as diferenças de contaminação dos produtos comercializados com e sem regulamentação. Além disso, a determinação do perfil de virulência e de suscetibilidade de *S. aureus* isolados possibilitará que ações de vigilância em saúde sejam propostas com objetivo de controle sanitário dos alimentos, propiciando maior segurança ao consumidor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de queijo tipo Minas frescal produzidos de forma industrializada e artesanal comercializados no município de Goiânia, Goiás. Além disso, determinar o perfil de virulência e a sua suscetibilidade a antimicrobianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e quantificar *S. aureus* de amostras de queijo Minas frescal industrializados e artesanais;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos;
- Pesquisar a presença de genes que codificam a produção de enterotoxinas e outros fatores de virulência nos *S. aureus* isolados dos queijos Minas frescal avaliados;
- Determinar a similaridade genética dos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Este estudo é do tipo transversal, desenvolvido em feiras livres e supermercados da cidade de Goiânia, Goiás. A relação e o endereço dos estabelecimentos comerciais pesquisados foram fornecidos pela Junta Comercial do Estado de Goiás (JUCEG). A lista de feiras livres de Goiânia foi fornecida pela Secretaria Municipal da Indústria, Comércio e Serviços (SEMIC) (ANEXO A).

Para definição da amostragem das feiras visitadas, considerou-se aquelas existentes nos sete distritos sanitários de Goiânia estabelecidos pela Secretaria Municipal de Saúde (Campinas, Leste, Noroeste, Norte, Oeste, Sudoeste e Sul). Do total de 116 feiras livres localizadas nos bairros pertencentes aos distritos supracitados, quatro feiras foram descartadas uma vez que foram desativadas no período do estudo. Assim, selecionou-se 56 feiras (50%) por meio de sorteio aleatório para obtenção das amostras de queijo Minas frescal artesanal.

As amostras de queijo Minas frescal do tipo industrializado foram obtidas considerando todas as marcas disponíveis nas redes de supermercados, localizados nos distritos sanitários acima elencados. Os supermercados escolhidos para a coleta das amostras também foram selecionados por sorteio aleatório, onde cada distrito foi representado por um supermercado sorteado. As amostras coletadas foram compradas segundo características desejadas pelo consumidor no momento da compra, como: coloração branca, aroma suave e consistência macia.

4.2 COLETA DE DADOS

Nos supermercados sorteados, foram coletadas apenas amostras de queijo Minas frescal industrializado, de todas as marcas disponíveis à venda.

Foram visitados sete supermercados, sendo um de cada distrito. Considerando a disponibilidade de marcas do produto, obteve-se 10 amostras,

quantidade essa justificada pois alguns supermercados apresentavam mais de uma marca de queijo Minas frescal no dia da coleta.

Foram coletadas 56 amostras de queijo Minas frescal do tipo artesanal em somente um ponto de venda por feira livre, definida por sorteio. Foi garantida a não repetição do mesmo vendedor em outra feira visitada, pois no momento da coleta foi identificado o nome do fornecedor e outras feiras realizadas por ele. O número de feiras pesquisadas por distrito é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Número de feiras livres distribuídas por Distritos Sanitários pertencentes ao Município de Goiânia – GO.

Distritos Sanitários	Total de Feiras Livres	Feiras Livres visitadas
Oeste	14	7
Campinas	20	10
Leste	18	9
Sul	12	6
Sudeste	16	8
Norte	16	8
Noroeste	16	8
Total	112	56

A coleta foi realizada no período matutino e vespertino, considerando o horário de funcionamento das feiras livres e dos hipermercados. A unidade amostral foi constituída no mínimo de 300g do produto embalado pelo próprio vendedor. Foram coletadas no total, 66 amostras de queijo tipo Minas Frescal.

Após a coleta, o produto embalado pelo feirante, foi colocado pelo pesquisador em um saco de polietileno de alta densidade, esterilizado, identificado e lacrado, e acondicionado em caixa isotérmica com placa de gelo reciclável. O transporte das amostras ocorreu em um prazo máximo de duas horas até o Laboratório de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos da Faculdade de Nutrição/UFG. O período entre a coleta e processamento das análises microbiológicas não ultrapassou o tempo de 48 horas.

4.3 LOCAL DAS ANÁLISES

As análises microbiológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Controle Higiênico Sanitário de Alimentos da Faculdade de Nutrição. Já as análises moleculares, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambientes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas obedeceram à metodologia oficial prevista na *American Public Health Association* (LANCETTE; BENNETT, 2001) e *Food and Drug Administration* (BENNETT; LANCETTE, 2001).

4.4.1 Contagem de *Estafilococos coagulase positiva*

Para o preparo da amostra, 25 g foram pesados e homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril (DOWNES; ITO, 2001). Após a homogeneização, realizou-se a semeadura de 0,1 mL da amostra em superfície de Ágar *Baird-Parker* (BP) suplementado com emulsão de gema de ovo a 50% e telurito de potássio 1% com incubação a 37 °C, por 48 horas.

Foram contadas as colônias típicas (negras, pequenas, lisas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo de degradação da lecitina) e atípicas (negras, sem halo). Uma colônia representativa de cada morfotipo foi repicada em ágar nutriente inclinado e incubada a 37 °C por 24 horas. Colônias características do gênero *Staphylococcus* foram utilizadas juntamente com o fator de diluição para calcular o número de UFC/g da amostra (BENNETT; LANCETTE, 2001). A partir desta etapa, as colônias foram submetidas à coloração de Gram, prova de coagulase, catalase, e DNase.

Após o isolamento e a identificação, os isolados foram congelados a - 80 °C em caldo tripticase de soja (TSB) com 20% de glicerol, para posterior caracterização molecular (ANVISA, 2006).

4.4.2 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos – Método de Disco-Difusão

Após o descongelamento, os isolados foram repicados em ágar nutriente e suspensos individualmente em 2 mL de salina a 0,85%, a fim de se obter turbidez óptica comparável à solução padrão de Mac Farland 0,5. Em seguida, foi feita a inoculação com *swab* esterilizado na superfície do ágar *Müller Hinton* nos sentidos horizontal e vertical, para assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Com auxílio de uma pinça flambada os discos de antimicrobianos foram transferidos para a superfície da placa semeada. Os antibióticos testados foram: penicilina (10UI), cefoxitina (30µg), sulfametoxazol/trimetoprim (1,25/23,7525 µg), rifampicina (5µg), ciprofloxacina (5µg), tetracilina (30 µg), eritromicina (15µg), quinupristina/dalfopristina (15 µg), clindamicina (2µg). As placas contendo os antibióticos foram incubadas a 35-37 °C por 18-24 horas. A leitura e interpretação do teste foram realizadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014).

4.5 TIPAGEM MOLECULAR

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

As amostras foram descongeladas e inoculadas em placas de TSA com incubação a 37 °C/24 horas. Após esse período, três a quatro colônias foram suspensas em 50 µL de solução tampão TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) com 1 µL de lisostafina (10 mg/mL) e incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, para o processo de desnaturação, a suspensão foi reincubada em banho-maria a 95 °C por 15 minutos e adicionada de 150 µL de H₂O MiliQ autoclavada com posterior centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi utilizado como DNA *template* de DNA para as reações de PCR (AIRES DE SOUSA et al. 2007).

4.5.2 Identificação molecular de *Staphylococcus aureus*

A amplificação do gene *femA* foi realizada para confirmar a espécie (*S. aureus*) de todos os isolados seguindo protocolo sugerido por Mehrotra, Wang e Johnson (2000). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação foram: *femA*-F: 5'

AAAAAAGCACATAACAAGCG 3' e *femA*-R: 5' GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3', para obtenção de um produto de 132 bp.

A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂); 100 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase; 20 ng do DNA *template*. Para a reação de amplificação foi utilizado o programa: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 57 °C, 1 minuto a 72 °C e uma extensão adicional de 7 minutos a 72 °C. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1 X por 60 minutos a 100 V. Os géis foram visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e fotografados sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad).

4.5.3 Detecção Molecular de Genes de Virulência

Os isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos à detecção de genes de virulência pela técnica de multiplex PCR de acordo com Jarraud et al. (2002) e Holtfreter et al. (2007) com modificações, realizando-se quatro reações. Os pares de oligonucleotídeos utilizados estão descritos no Quadro 2. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: volume final de 25 µL contendo 5µL de tampão de reação 5X [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)], 100 µM de cada dNTP, 5,0 mM de MgCl₂, 1,0 µL de cada oligonucleotídeo, 1,0 U de *Taq* DNA, e 10 a 20 ng de DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador (Axygen) seguindo o programa: 15 minutos a 95 °C, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 30 segundos a 56 °C, 50 segundos a 72 °C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1 X por 90 minutos a 100 V. O marcador de 50 bp foi utilizado como padrão de peso molecular. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL. visualizado e fotografado sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad).

Quadro 2. Oligonucleotídeos usados na detecção de genes de virulência.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' – 3')	Amplicon (bp)	Reação
TSST F TSST R	TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	180	I
SEC F SEC R	GTAAAGTTACAGGTGGCAAACTTG CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	297	
SEB F SEB R	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	
SEI F SEI R	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	576	
SEO F SEO R	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA ATCTTTAAATTGAGCAGATATTCCATCTAAC	180	II
SEJ F SEJ R	TAACCTCAGACATATATACTTCTTAACG AGTATCATAAAGTTGATTGTTTTTCATGCAG	300	
SEE F SEE R	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC CACCTTACCGCCAAAGCTG	482	
ETB F ETB R	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	612	
ETA F ETA R	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT TGGTACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	190	III
SEM F SEM R	CTATTAATCTTTGGGTAAATGGAGAAC TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	326	
SED F SED R	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG GCTGTATTTTTCTCCGCTAAATAATATG	492	
SEG F SEG R	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACSSSSGGTACTAGTTC	642	
HLA F HLA R	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209	IV
HLB F HLB R	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	
SEH F SEH R	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	376	
SEA F SEA R	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	560	
SEN F SEN R	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT AACTCTGCTCCCACTGAAC	680	

Fonte: Jarraud et al. (2002).

4.5.4 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* -PFGE)

O perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados foi determinado pela técnica de PFGE, após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I (CHUNG et al. 2000). Após cultivo dos isolados de *S. aureus* em TSB e incubação a 37 °C por 18-24 horas, as células tiveram sua concentração ajustada em tampão Tris-NaCl (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 1M) em espectrofotômetro pelo cálculo da OD 620_{nm} ($V \text{ add } (\mu\text{L}) = OD \times 40 \times 210 - 210$).

A suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 100 µL de agarose LMP (*Low Melting Point* agarose, Invitrogen®) 1,5% para formação de pequenos blocos de agarose (*plugs*). As células bacterianas contidas nos *plugs* foram lisadas por cinco horas em solução EC (Tris 6 mM pH 8,0; NaCl 1 M; EDTA 0,1 M pH 8,0; desoxicolato de sódio 0,2% e sódio laurilsarcosina 0,5%) acrescida de uma solução de lise composta por lisozima (100 µL/mL – Sigma®), lisostafina (50 µL/mL – Sigma®) e RNase (50 µL/mL – Sigma®). Após esse período, foi realizada a desproteínização em solução ES (EDTA 0,5 M, pH 9,0 e sódio laurilsarcosina 1%) com Proteinase K (1 mg/mL) (Invitrogen®) por um período mínimo de 17 horas a 50 °C. Após a incubação, os blocos de gel foram lavados (cinco lavagens com incubações de 30 minutos cada) com a solução tampão TE (Tris 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4 °C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

4.5.4.1 Condições de digestão e eletroforese

Para cada isolado, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 20 U da enzima de restrição *Sma*I em 100 µL de tampão 1X por pelo menos seis horas a temperatura ambiente. Foram utilizadas as seguintes condições de eletroforese: corrente alternando com intervalos de pulso de cinco a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14 °C por 22 horas.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose de corrida a 1% em solução tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5X – TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (1 µg/mL) por uma hora, descorados em H₂O/15' e visualizados sob luz UV em transiluminador e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad). A análise do perfil

dos fragmentos de macrorrestrição resultantes foi realizada por inspeção visual segundo os critérios sistematizados por Tenover et al. (1995). Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco invertidas de oito bits e processados pelo programa BioNumerics (versão 5.0; *AppliedMaths, Ghent, Belgium*).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados segundo estatística descritiva em frequência absoluta e relativa. Utilizou-se o Teste Análise de Variância para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto não foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que não se tratou de pesquisa com seres humanos. Todavia, foram garantidos os critérios da resolução nº 466/2012 (BRASIL, 2012).

REFERÊNCIAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos**. 2011. Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17. Acesso em: 29 out 2013.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **País multiplica por quatro venda de produtos lácteos aos árabes**. 2014. Disponível em: http://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=1286&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6. Acesso em: 30 set 2014.

AIRES DE SOUSA, M.; PARENTE, C. E.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I. C.; SILVA, D. A.; DE LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3845-3849, 2007.

AL-TARAZI, Y.; ALBETAR, M.; ALABOUDI, A. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International**. v. 42, p. 374-379, 2009.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. Utilização do Antibiógrama como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Manipuladores , Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, suplemento, p. 102-108, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos**. 2006. 58 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Publicacao+Servicos+de+Saude/Manuais+Manual+de+Controle+Interno+da+Qualidade+para+Testes+de+Sensibilidade+a+Antimicrobianos>. Acesso em: 16 ago 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. 2014. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>. Acesso em: 20 ago 2014.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.; SUZUKI, K.; SILVA, M. G.; JÚNIOR, A. F.; RALL, R.; RALL, V. L. M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food control**, Berkshire, v. 18, n. 6, p. 630-634, 2007.

ARAÚJO, J. M.; GALDINO, M.; AMARAL, S. M. MRSA de origem comunitária. **Residência Pediátrica**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 39-40, 2011.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in

the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Rio de Janeiro, v.92. p.1172-1177, 2002.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: _____. MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 116-1377.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

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

ÁVILA, R.; ANDRADE, R. P.; MACHADO JÚNIOR, D. R.; RABELO, R. P.; SILVA, M. R. Práticas higiênico-sanitárias na manipulação de alimentos: diagnóstico e intervenção. **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 117-124, 2010.

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

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: _____. **Manual of clinical microbiology**. American Society for Microbiology: Washington, p. 384 – 404, 2003.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Methods**. Food and Drug Administration, Chapter 12. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>. Acesso em: 01 setembro 2013.

BERGDOLL, B. M. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.

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 sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

BLANC, D. S.; STRUELENS, M. J., DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; HAUSER, P. M.; PETIGNAT, C.; FRANCIOLI, P. Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3442-3445, 2001.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, jan. 2001.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. **Diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisas envolvendo seres humanos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2012b. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>. Acesso em: 02 Jan 2015.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; 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 cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 9-14, 2002.

CDC - Centers of Disease Control and Prevention. **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Crave Brothers Farmstead Cheeses**. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>>. Acesso em: 26 mai2014.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 77-88, 2009.

CHA, J.; VAKULENKO, S. B. MOBASHERY, S. Characterization of the b-lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Biochemistry**, Montreal, v. 46, n. 3, p. 7822-7831, 2007.

CHAPAVAL, L.; LUA, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 299-306, 2008.

CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 189-197, 2004.

CHUNG, M. L. H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; AIRES DE SOUSA, M.; CAMOU, T. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 6, p. 189-198, 2000.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-four Informational Supplement**. CLSI document M-100 S-24. Wayne: PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

DELSOL, A. A.; HALFHIDE, D. E.; BAGNALL, M. C.; RANDALL, L. P.; ENNE, V. I.; WOODWARD, M. J.; ROE, J. M. Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2-3, p. 249-253, 2010.

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

DORIGON, C. O Mercado Informal dos Produtos Coloniais da Região Oeste de Santa Catarina. V ENEC - **Encontro Nacional de Estudos do Consumo I Encontro Luso-Brasileiro de Estudos do Consumo Tendências e ideologias do consumo no mundo contemporâneo**. 2010. Disponível em: http://estudosdoconsumo.com.br/wpcontent/uploads/2010/09/1.3-_Clovis_Dorigon1.pdf >. Acesso em: 03 nov 2013.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. American Public Health Association, 2001. 659 p.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. **Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date**. 2015. Disponível em: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>. Acesso em: 05 jul 15.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, Stockholm, v. 13, n.1, 162p., 2015.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

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

FERREIRA, H. B. Organização Gênica de Procariotos. In: _____. ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. p. 64-77.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMITH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n. 1, p.63-70, 2001.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infections, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 9, p. 430–440, 2009.

FOSHEIM, G. E.; NICHOLSON, A. C.; ALBRECHT, V. S.; LIMBAGO, B. M. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Toxin Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Atlanta, v. 49, n. 8, p. 3071-3073, 2011.

FOXMAN, B.; RILEY, L. W. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 153, n. 12, p.1135-1141, 2001.

FRANCO, B. D. G. M. Critérios Microbiológicos para Avaliação da Qualidade de Alimentos. In:_____. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 8, p. 149-154.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu 2. ed. 2008. 184p.

FREITAS, A. C. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 5, p. 62-65, 1993.

GANDRA, E. A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de Testes Bioquímicos e da Amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc***. 2003.101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

GARCÍA-CASTELLANOS, R.; MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ, G.; MARRERO, A.; POTEMPA, J.; COLL, M.; GOMIS-RUTH, F. X. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: *Mecl* repressor in complex with its operator. **Journal of Biological Chemistry**, Barcelona, v. 279, n. 17, p. 17888-17896, 2004.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, London, v. 1, n. 3, p. 191-203, 2007.

GIEZENDANNER, N.; MEYER, B.; GORT, M.; MULLER, P.; ZWEIFEL, C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. **Schweizer Archiv Tierheilkunde**, v. 7, n. 151, p. 329 – 331, 2009.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J. C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, Mar, v. 2,n. 359, p. 753-9, 2002.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 916-921, 2009.

HAVERI, M.; ROSLÖF, A.; RANTALA, L.; PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non persistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 993–1000, 2007.

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

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KUROSA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**. Cambridge, v. 9, p. 486-493, 2001.

HOLTFRETER, S.; GRUMANN, D.; SCHMUDDE, M.; NGUYEN, H. T. T.; EICHLER, P.; STROMMINGER, B.; KOPRON, K.; KOLATA, J.; GIEDRYS-KALEMBA, S.; STEINMETZ, I.; WITTE, W.; BRÖKER, B. M. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.8, p. 2669-2680, 2007.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G. MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, V.70, n.2, p. 631–641, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 6. ed. 2005. 712p.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERIOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by *egc*-Encoded Enterotoxins. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 7, n.6, p. 997-1004, 2015.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220-228, 2010.

JONES, T. F.; KELLUM, M. E.; PORTER, S. S.; BELL, M. SHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 8, n. 1, p. 82-84, 2002.

JORDA, G. B.; MARUCCI, R. S.; GUIDA, A. M.; PIRES, P. S.; MANFREDI, E. A. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. **Argentina Journal of Microbiology**, Buenos Aires, v. 44, n. 2, 2012.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, p. 267 – 272, 2005.

KARAHAN, M.; AÇIK, M.N.; CETINKAYA, B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolate from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1029-1035, 2009.

KLEVEN, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J. S.; GERSHMAN, K. R. S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; DUMYATI, G. TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIN, S. K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of the American Medical Association**, New York, v. 298, n. 15, p. 1763-1771, 2007.

KLUYTMANS, J. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 11-15, 2010.

KLUYTMANS, J. A.; WERTHEIM, H. F. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 1, p. 3-8, 2005.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. In: Texto e Atlas Colorido. Medsi: Rio de Janeiro, p. 551-588, 2008.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Enterotoxins In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. APHA: Washington DC, 4 ed. Chapter 39. p. 387-397, 2001.

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

LEVIN, B. R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. **Science**, Washington, v. 283, n. 5403, p. 806-809, 1999.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, I. A. G. Microbiologia de queijo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1-8, 2004.

MARTÍN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M. C. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 279-86, 2004.

MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALMEIDA, M. G. A. A.; ROCHA, C. C. M.; PINHEIRO, D. P. M.; FIGUEIREDO, A. Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas

de diferentes espécies animais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2001.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 – 2013**. 2013. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>. Acesso em: 28 set 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier: Rio de Janeiro, p. 234 – 246, 2006.

NAGASE, N.; SHIMIZU, A.; KAWAN O, J.; YAMASHITA, K.; YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 12, p. 1169- 1172, 2002.

NDDIC - National Digestive Diseases Information Clearinghouse. **Foodborne Illnesses**. 2012. Disponível em: <http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/bacteria/>. Acesso em: 26 mai 2014.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Valenzano Bari, v. 98, n. 1, p. 73-79, 2005.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M. L.; GUILLIER, F.; GROULT, J. FELIX, B.; SALAH, S.; DELMAS, G.; HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to *staphylococcal enterotoxin* type E, France, 2009, **Euro Surveill**, v. 15. 2010.

PAULIN, S.; HORN, B.; HUDSON, J. A. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in dairy products. **Manual Prepared for the Ministry for Primary Industries**, 2012, 83p.

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

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIAZZON-GOMES, J. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n.1, p. 77-85, 2010.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. *Staphylococcal* Enterotoxins. **Toxins**, Basel, v. 2, p. 2177-2197, 2010.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR., Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

PROFT, T.; FRASER, J. D. Bacterial superantigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v.133, n. 3, p. 299-306, 2003.

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**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Bológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 38-46, 2010.

SCALLAN, E.; HOEKSATRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

SENNA, J. P. M.; PINTO, C. A.; CARVALHO, L. P. S.; SANTOS, D. S. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 6, p. 2254 - 2256, 2002.

SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R.; CARMO, L.S.; MENEZES, L. D. M.; OLIVEIRA, D. L. S.; ANDRADE, E. H. P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 465-470, 2012.

SHIMIZU, A.; FUJITA, M.; IGARASHI, H.; TAKAGI, M.; NAGAS, N.; SASKI, A.; KAWANO, J. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980 – 1995) in Tokyo, Japan, by

pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Berlin v. 38, n. 10, p. 3746-3749, 2000.

SILVA, J.; SAUER, P.; KOLAR, M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Shaphylococcus aureus* at the university hospital in Olomouc. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, Olomuc, v. 153, n. 3, p. 215-218, 2009.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2005. 623 p.

SINGER, R. S.; SISCHO, W. M.; CARPENTER, T. E. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis **Journal of Clinical Microbiology**, Berlin, v. 42, p. 5502-5511, 2004.

SMYTH, D. S.; KENNEDY, J.; TWOHIG, J.; MIAJLOVIC, H.; BOLTON, D.; SMYTH, C. J. *Staphylococcus aureus* isolates from Irish domestic refrigerators possess novel enterotoxin and enterotoxin-like genes and are clonal in nature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 3, p. 508-515, 2006.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S. R.; ESPÍNDOLA, M. L.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 2, p. 517-520, 2008.

STRUELENS, M. J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical Microbiological and Infection**, v. 2, n. 1, p. 50-59, 1996.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. A.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**. São Paulo, v. 33, p. 2233-39, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 426-439, 1997.

VAN BELKUM, A.; STRUELENS, M.; VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 5, p. 547-560, 2001.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: **VII Congresso Brasileiro de Higienistas de alimentos e I Congresso Latino-Americano de Higienistas de Alimentos**, Belo Horizonte, 2003.x

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; SOUZA, M. R. M.; CHAVES, J. B. P. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 2023-2029, 2010.

VON EIFF, C.; FRIEDRICH, A. W.; PETERS, G.; BECKER K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Jul, v. 49, n. 3, p. 157-62, 2004.

XU, S. X.; MC CORMICK, J. K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 2, n. 52, p. 1-11, 2012.

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

YAN, X.; WANG, B.; TAO, X.; HU, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; LIN, Y.; YOU, Y.; SHI, X.; GRUNDMANN, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6637-6642, 2012.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MARTA, D.; BORCH, E.; RADSTROM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 31, p. 69–74, 2010.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.1, p. 44-48, 2010.

WERB, E. O futuro está nos genes - Zero Hora. **Revista ZH**, Porto Alegre, p. 4-7, 1999.

WHO - World Health Organization. **Foodborne disease surveillance**. 2013a. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/en/index.html>. Acesso em: 22 abr 2015.

WHO - World Health Organization. **Prevention of foodborne disease: Five keys to safer food**. 2013b. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys/en/>>. Acesso em: 29 abr 2015.

WINN, JR. W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1535p, 2006.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de

alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciência**, Rio Grande do Sul, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

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

ZOLI, J. A.; NEGRETE, I. R. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 95, p. 62-70, 2002.

ZSCHOCK M.; KLOPPERT, B. WOLTER W.; HAMANN, H. P.; LAMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 243 – 249, 2005.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

O manuscrito foi submetido ao periódico Journal of Dairy Science (ISSN: 0022-0302), cujo Qualis-Capes na área de Nutrição é B1 e o fator de impacto, segundo o Journal of Citation Reports®, é 2.573. As instruções aos autores para submissão de manuscritos neste periódico estão apresentadas no Anexo B.

Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese

Ferreira et al.

The Minas frescal cheese is a very popular food in Brazil and can be handmade (from raw milk) or industrialized (from pasteurized milk). Contamination with pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus* is very common. This bacterium when present in food may produce enterotoxins, which cause food poisoning. Therefore, the aim of this study was to evaluate the contamination by *S. aureus* in artisanal and industrialized Minas frescal cheese, and to detect genes that code for virulence factors.

CHARACTERIZATION OF *S. AUREUS* FROM ARTISANAL CHEESE

Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese

M. A. Ferreira,* L. G. Bernardo,* L. S. Neves,† M. R. H. Campos,* J. Lamaro-Cardoso,† M. C. P. André,†¹

* Faculty of Nutrition, and

†¹ Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia 74605-050

¹ Corresponding author: Maria Cláudia Porfírio André, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, rua 235, s/n, sala 422, Setor Universitário. Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74605-050. Phone: (55 62) 3209-6361; FAX: (55 62) 3209-6363.

E-mail: mcporfirio@hotmail.com

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal and industrialized Minas frescal cheeses, to determine their antimicrobial susceptibility profile as well as the genetic similarity among the isolates. The isolates were also tested for staphylococcal enterotoxin (SE) genes and other virulence factors. Fifty-six artisanal raw milk cheeses sold at street fairs and 10 industrialized cheeses commercialized in supermarkets of Goiânia, Goiás were analyzed. *S. aureus* was confirmed in 19 samples (33.9%) of artisanal cheese by detection of *femA* gene, in which 29 isolates were obtained. These isolates were submitted to the antimicrobial susceptibility test and classified into nine different profiles (A-I). Thirteen isolates (44.8) were resistant to penicillin and three (10.3) to tetracycline, with two (7.4) resistant to both. The multiplex PCR technique was performed to detect virulence genes that code for the production of hemolysins (Hla and Hlb), toxic shock syndrome toxin (TSST-1), exfoliative toxins (ETa and ETb), and enterotoxins (SEA - SEE, SEG - SEJ, SEM - SEO). All the isolates amplified for the *hla* gene and 14 (48.3%) for the *hnb* gene. The *seh* gene was the most frequently detected (n=11, 37.9%), followed by *seo* gene (n=3; 10.3%). In one isolate (3.4%), four enterotoxins genes were detected, and in another, six (3.4%). The comparison performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis of the 29 isolates revealed 18 genotypic profiles, which were grouped into five clusters. The genotyping found high genetic similarity among the isolates. Identical isolates were obtained from different samples and one sample showed more than one genetically different isolate. The high prevalence of *S. aureus* in the Minas Frescal cheese samples, as well as the detection of toxin encoding genes identified in this study, warns of the necessity to reduce the contamination levels in this type of cheese through monitoring and controlling the production and trade of the product.

Key words: *Staphylococcus aureus*, cheese, antimicrobial resistance, staphylococcal enterotoxin.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is one of the most important human and animal pathogens. It has a broad set of virulence mechanisms associated with infectivity, production of toxins, and antimicrobial resistance (Argudin et al., 2010).

Some strains of *S. aureus* can produce toxins that are members of pyrogenic toxin superantigen family (PTSAg), such as the staphylococcal toxic shock syndrome toxin (TSST-1), which is responsible for generating an immune hyper-response in the host and has already been detected in *S. aureus* isolated from foods (Cha et al., 2007). These bacteria can produce exfoliative toxins-ET, which promote the cleavage of the skin extract, causing severe cutaneous syndromes (Zschock et al., 2005). Most strains secrete enzymes and cytotoxins that include coagulase and four hemolysins (alpha, beta, gamma, and delta). Alpha and beta hemolysins (Hla and Hlb) induce pro-inflammatory changes in the cells, turn off the immune system by direct cytotoxic effect, and degrade tissues (Zschock et al., 2005).

Among the toxins produced by *S. aureus*, Staphylococcal Enterotoxins (SE) are a concern, because when produced in foods SE can cause food poisoning, which is one of the most prevalent food-borne diseases around the world (ECDC, 2015). These toxins present emetic activity and are called classic enterotoxins (SEA - SEE), which occur more frequently in cases and outbreaks of food poisoning, along with other more recently identified (SEG, SEH, SEI, SER, and SET (Wallin-Carlquist et al., 2010; Xu and McCormick, 2012). In addition to these, other enterotoxins called Staphylococcal enterotoxins-like proteins (SEl) include the SEl J, K, L, M, N, O, P, Q, S, U, and V. The SEl/s toxins, although both homologous and structurally similar to the SEs, either do not induce emesis or have not been confirmed to induce emesis in humans (Xu and McCormick, 2012).

99 immediately transported to the laboratory in a refrigerated box (4 to 8 °C) and kept at 4 °C until
100 analysis.

101 ***Isolation of Coagulase-Positive Staphylococci***

102 To enumerate coagulase-positive *Staphylococci* (CPS), the samples were processed by
103 surface plating on Baird-Parker agar with egg yolk tellurite emulsion and incubated at 37 °C
104 for 48 h under aerobic conditions. Up to 5 typical and/or atypical presumptive colonies were
105 selected and tested using standard microbiological procedures such as Gram staining, catalase,
106 thermostable nuclease, and coagulase production (Bennett and Lancette, 2001).

107 ***Antimicrobial Susceptibility Test – Disk Diffusion Method***

108 All CPS isolates were subjected to an antimicrobial susceptibility test by disc diffusion
109 method on Mueller Hinton agar (CLSI, 2015). Penicillin (10 UI), cefoxitin (30 µg),
110 trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), rifampin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg),
111 tetracycline (30 µg), erythromycin (15 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg), and clindamycin
112 (2 µg) were used as antimicrobial agents. *S. aureus* ATCC 25923 was used as reference strain
113 for antimicrobial susceptibility testing.

114 ***DNA extraction***

115 The DNA extraction procedure was performed according to Aires de Sousa et al. (2007).
116 From the overnight Tryptone Soya Agar culture, three to four colonies were suspended in 50
117 µL of TE 1X buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) with 1 µL of lysostaphin (10 mg/mL)
118 and incubated at 37 °C. After 30 min, cell suspensions were placed in a boiling-water bath at
119 95 °C for 15 min. Then, 150 µL of H₂O MiliQ was added and the solution was centrifuged
120 (13,000 g) for 5 min. The resulting supernatants were used as DNA templates in the PCR
121 reactions

122 ***Identification of Staphylococcus aureus***

123 The CPS isolates were screened by PCR for the presence of *femA* gene, which is specific
 124 for *S. aureus*, according to Mehrotra et al. (2000). The primers used for gene amplification were
 125 *femA*-F: 5' AAAAAAGCACATAACAAGCG 3' and *femA*-R: 5'
 126 GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3', to obtain a 132 bp amplicon.

127 The PCR reaction was performed in a reaction mixture with a final volume of 50 µL
 128 containing 10 µL of 5X reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 1.5 mM
 129 MgCl₂, 100 µM of each dNTP, 0.2 mM of *femA* primers, 2.5 U *Taq* polymerase, and 20 ng of
 130 template DNA. The volume of this mixture was adjusted to 50 µL with sterile deionized water.
 131 As positive controls, PCR reactions were carried out in parallel and contained template DNA
 132 extracted from the standard strains of *S. aureus* ATCC 25923. PCR was performed under the
 133 following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min, subsequently followed by 35
 134 cycles at 94 °C for 2 min, 57 °C for 2 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension of 7 min
 135 at 72 °C. The amplified products were detected by electrophoresis on 1.5% gel agarose
 136 containing ethidium bromide (0.5 µg/mL). The electrophoresis was carried out at 100 V for 1
 137 h. The PCR products were visually examined and photographed under UV illumination.

138 ***Detection of Virulence genes***

139 The multiplex PCR technique was performed on all *S. aureus* isolates to detect virulence
 140 genes that code for the production of hemolysins (Hla and Hlb), toxic shock syndrome toxin
 141 (TSST-1), exfoliative toxins (ETa and ETb), and enterotoxins (SEA - SEE, SEG - SEJ, SEM -
 142 SEO), through four sequential reactions, according to Jarraud et al. (2002) and Holtfreter et al.
 143 (2007) with modifications. All the primer pairs used in this study and the multiplex reactions
 144 are listed in Table 1.

145 PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl containing reaction buffer (5X)
 146 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0), 5.0 mM MgCl₂, 100 mM of dNTP, 150 to
 147 400 nM of each primer, 1.0 U of *Taq* DNA polymerase, and 10 to 20 ng of DNA template.

148 The PCR samples were subjected to amplification using thermocycler (Axygen)
149 according to the following program: initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 35
150 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s, 72 °C for 50 s, and a final
151 extension at 72 °C for 10 min. Amplicons were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis
152 in 1X TBE at 100 V for 90 min and viewed under Gel Doc XR UV transilluminator. The gel
153 images were analyzed with the QuantityOne software (Bio-Rad Laboratories, USA) after
154 ethidium bromide (0.5 µg/mL) staining.

155 *Molecular subtyping of S. aureus isolates*

156 Strains identified as *S. aureus* by PCR were submitted to Pulsed Field Gel
157 Electrophoresis (PFGE) using 20U *Sma*I restriction enzyme overnight, according to Chung et
158 al. (2000). Electrophoretic run was performed in Tris Borate EDTA (TBE) 0.5X buffer (Tris
159 90 mM, Boric acid 90 mM, and EDTA 2 mM) using CHEF DRII System (Bio-Rad
160 Laboratories, Hercules, USA), under the following conditions: 6 V/cm for 22 h, pulse times
161 from 5 to 35 s at 14 °C. *S. aureus* strain NCTC 8325 was used as reference standard.

162 After being run, the gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and viewed
163 with UV trans-illuminator. Gel images were captured by Molecular ImagerGelDoc XR
164 (BioRad) and analyzed with BioNumerics program (version 5.1; AppliedMaths, Ghent,
165 Belgium). Clustering was performed by Unweighted Pair Group Method using Arithmetic
166 averages (UPGMA). Similarity of strains was estimated using Dice correlation coefficient with
167 0.7% optimization and 1.0% tolerance setting. For clustering of strains, a cut-off of 80% was
168 applied (Carriço et al., 2005). Identical PFGE profiles (100% of similarity) were defined as a
169 pulsotype (PT). Gels were also analyzed by visual examination of the banding patterns to
170 differentiate between the undistinguishable closely related strains, which were possibility
171 related or unrelated (Tenover et al., 1995).

172 **RESULTS AND DISCUSSION**

173 ***Coagulase positive Staphylococci***

174 From 10 industrialized Minas frescal cheese samples analyzed, two (20.0%) presented
 175 CPS counts higher than the limits established as maximum legal limit (1.0×10^3 cfu/g) by
 176 Brazilian legislation (Brasil, 2001). The artisanal Minas frescal cheese was found to be
 177 potentially hazardous to public health because levels of contamination ranged from 1.2×10^3 to
 178 1.5×10^7 cfu/g in 19 (33.9%) in the evaluated samples. Eight (14.3%) of them were higher than
 179 10^5 cfu/g, which presenting a great risk of food poisoning (Balaban and Rasooly, 2000).

180 The presence of CPS in cheeses made from pasteurized milk may indicate failure in
 181 pasteurization or recontamination after pasteurization due to insufficient hygienic and sanitary
 182 practices (O'Brien et al., 2009). High counts of CPS in raw milk cheese are expected, because
 183 that milk can be contaminated directly from the production environment, the infected animal,
 184 or food handler (Spanu et al., 2014). Variable results have been observed by other authors in
 185 samples obtained in Brazil such as 21.0% in Bahia and 31.2% in Pernambuco (Evêncio-Luz et
 186 al., 2012) and 54.2% in Goiás (André et al., 2008).

187 ***S. aureus identification***

188 Overall, 29 isolates were taken from the 19 CPS positive raw milk cheese samples
 189 analyzed and were confirmed as *S. aureus* by phenotypic characterization and *femA* detection,
 190 unlike those obtained from industrialized pasteurized cheese.

191 The presence of *S. aureus* in fresh raw milk cheeses is a frequent finding around the
 192 world and the prevalence varies, for example 2.2% (Vitale et al., 2015) and 35.0% (Bianchi et
 193 al., 2013) in Italy; 10.9% (Jamali et al., 2015) and 45.0% (Saadat et al., 2014) in Iran; 37.5% in
 194 Turkey (Gücükoğlu et al., 2012); 54.2% in Brazil (André et al., 2008); and 69.0% in Sweden
 195 (Rosengren et al., 2010). In Switzerland, between 1996 and 2006, 63.6% of the staphylococcal
 196 food poisoning outbreaks reported were associated with the cheese consumption (Baumgartner,
 197 2008).

198 The handmade process in Brazil does not involve the step of milk pasteurization, which
 199 is very important for the quality control and safety of this product. André et al. (2008) observed
 200 that the main source of contamination of the final product was the raw milk used in its
 201 manufacture, compared with strains isolated from handlers in artisanal cheese produced in the
 202 Goiás State, Brazil.

203 *Antimicrobial susceptibility profile*

204 The resistance patterns of *S. aureus* to the tested antimicrobial agents are presented in
 205 Table 2. The tests demonstrated the susceptibility of all *S. aureus* isolates to cefoxitin,
 206 trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampin, and erythromycin. Twelve (41.4%) isolates were
 207 susceptible to all nine antimicrobials tested, 13 (44.8%) and 3 (10.3%) were resistant to
 208 penicillin and tetracycline, respectively. Intermediate susceptibility was observed in one isolate
 209 (3.4%) for ciprofloxacin and clindamycin and in five (17.2%) for quinupristin/dalfopristin.

210 In this study, 12 isolates (41.4%) were resistant to 1, and 2 isolates (6.9%) were resistant
 211 to 2 antimicrobial agents. The resistance to penicillin remains the most common, as observed
 212 in other studies (André et al., 2008; Spanu et al., 2014; Jamali et al., 2015). The prevalence of
 213 resistance to β -lactam antibiotics is frequent in *S. aureus* strains obtained from milk and related
 214 products as reported by Daka et al. (2012), Hu et al. (2013), and Xu et al. (2014).

215 Several mechanisms are involved in β -lactam resistance, such as production of
 216 penicillinases or alteration of the target protein (Spanu et al., 2014). We did not find any isolate
 217 resistant to cefoxitin, indicating that the high resistance to penicillin observed should be as
 218 result of β -lactamases production.

219 Tetracycline resistance observed in this study (10.3%) was also found in Italy by Spanu
 220 et al. (2014) in strains isolated from cheese (10.6%). Tetracycline is used in intensive livestock
 221 production, which may explain the resistance observed in the literature in bacteria obtained
 222 from animal products (Schneider et al., 2009; Lee et al., 2014).

223 According to the patterns generated by the antimicrobial susceptibility tests, the 29
 224 isolates were grouped into nine distinct profiles, A - I (Table 2). Profile A grouped 13 isolates
 225 (44.8%) and profile B grouped nine (31.0%).

226 ***Detection of Virulence genes***

227 *S. aureus* groups are characterized by different virulence factors and by large variations
 228 in the presence of these virulence genes (Aydin et al., 2011). In this study, the presence of *tst*,
 229 *eta*, and *etb* genes were not found in the isolates. The *hla* gene was found in all isolates, and *hly*
 230 gene was found in 14 (48.3%) of them (Table 3). Silva et al. (2012) also found 100.0% of
 231 hemolytic activity among *S. aureus* isolated from bovine mastitis and most of them presented
 232 co-production of toxins.

233 According to Lo et al. (2011), the cytolysin production, including hemolysins,
 234 determines the pathogenicity of several bacterial agents and is associated with the pathogenesis
 235 of diseases caused by *S. aureus*. The hemolysins can be produced by the most *S. aureus* isolates
 236 (Burnside et al., 2010).

237 The synergistic effect between alpha and beta hemolysins is recognized as a determinant
 238 of the severity of *S. aureus* diseases, particularly bovine mastitis, with great ability of the
 239 pathogen to persist in the mammary gland, which may contaminate the milk and milk products
 240 (Aarestrup et al. 1999; Ohkura et al., 2009). Hly is characteristic of isolates obtained from
 241 bovine mammary gland; therefore, the findings suggest the probable source of cheeses
 242 contamination evaluated in this study.

243 From 29 *S. aureus* isolates, 13 (44.8%) presented genes coding for enterotoxins. The
 244 *seh* gene was the most frequently detected (n=11, 37.9%), followed by *seo* gene (n=3; 10.3%),
 245 *seg*, *sem*, *sen* genes (n=2; 6.9%), and *sec*, *sei* genes (n=1; 3.4%). In one isolate (3.4%), four
 246 genes coding for SEG and SEI M, N, and O were detected. In another isolate (3.4%), six genes

247 were present (SE C, G, I and SEI M, N, O). Both the isolates were obtained from the same
 248 artisanal raw milk cheese (Table 3).

249 The identification of new SE and SEI greatly increases the frequency of enterotoxigenic
 250 *S. aureus* isolates, which suggests an improvement on pathogenic potential of this bacteria
 251 (Bianchi et al., 2013). Among the SE, SEH has been responsible for staphylococcal food
 252 poisoning involving milk products (Jørgensen et al., 2005; Ostyn et al., 2010). Ikeda et al.
 253 (2005) described an outbreak due to the consumption of reconstituted milk, which was
 254 contaminated with enterotoxigenic *S. aureus* producing SEA and SEH. Another outbreak was
 255 attributed to SEH produced by *S. aureus* in mashed potatoes made with raw milk (Jørgensen et
 256 al., 2005).

257 SEH has been described as the most prevalent SE in bovine milk. Liu et al. (2014), who
 258 analyzed 116 isolates from bovine mastitis, detected *seh* gene in 36.3% and *sec* gene in 3.4%
 259 isolates. This is similar to the results obtained in the present study, and reinforces the possible
 260 source of cheese contamination. Bianchi et al. (2013) evaluating milk products found genes *sea*,
 261 *sed*, and *sec* in 23.1%, 47.0%, and 12.9% of the isolates, respectively as well as the genes *seg*,
 262 *seh*, *sei*, *sej*, *sep*, and *ser* in 33.3%, 4.7%, 34.5%, 46.7%, 1.17%, and 52.5%, respectively.

263 Several studies focused on the detection of genes coding classical SE (SEA-SEE). In
 264 those studies, the major prevalence was observed for *sea* gene although at low percentages such
 265 as 12.8% (Spanu et al., 2014), 5.0% (Saadat et al., 2014), 4.8% (Gücükoğlu et al., 2012), 2.2%
 266 (Vitale et al., 2015), and 1.6% (Ertas et al., 2010). Our study expanded the investigation for
 267 seven more SE or SEI (G, H, I, J, M, N, O), and we observed that only *sec* gene among the
 268 classical SE was detected in 3.4% of the cheese samples. This fact evidences the importance of
 269 searching for other SE especially in *S. aureus* obtained from food samples.

270 The presence of enterotoxins in milk products is considered a potential risk to public
 271 health. Several factors such as processing failures, inadequate refrigeration, improper hygienic

practices, and contamination after processing are associated with *S. aureus* multiplication and enterotoxins production (Saadat et al., 2014). Therefore, the establishment and implementation of safety regulations is essential in order to prevent staphylococcal food poisoning.

Molecular subtyping of S. aureus

The comparison of the 29 *S. aureus* isolated during the study were performed by PFGE. The isolates were assigned to 18 pulsotypes and grouped into five clusters (more than 80% of similarity) (Figure 1). Cluster (CL) 1 grouped 20 isolates obtained from 13 different raw milk cheese samples. The other four clusters grouped two isolates each and one isolate was not related to any cluster. This shows high genetic similarity among the isolates. This similarity can be explained by a possible sale of products from the same supplier in different street fairs. André et al. (2008) and Tondo et al. (2000) found more diversity among isolates obtained from dairy products in Middle West and Southern Brazil.

We observed that the some samples (Q3; Q9; Q15; Q18; Q24; Q35) presented more than one genetically distinct isolates and genetically identical isolates (100% similarity) were obtained from different samples. As demonstrated in Figure 1, one sample (Q35) contained four isolates that, although grouped in the same cluster, presented distinct pulsotypes, different susceptibility, or different virulence profile. This observation evidences that during the cheese production chain, the contamination could occur from several sources in the milk and cheese production environment, as well as the animal or food handler (Spanu et al., 2014). This fact could be minimized if the hygienic processing was intensified in order to prevent cross-contamination among the potential sources of food contamination.

All 11 *S. aureus* isolates harboring *seh* gene, obtained from ten different samples, were grouped in cluster 1, which evidence high similarity among these isolates, although they were isolated from samples produced in distinct places at different times. The genes coding for other SE (C, G, I, M, N, O), detected in two isolates obtained from the same sample, were grouped

297 in cluster 3 with 92.7% similarity. It has been demonstrated that *seh* gene is the most prevalent
298 in *S. aureus* isolates from bovine mastitis (Liu et al., 2014). The present study found *seh* gene
299 in 37.9 % of the *S. aureus* isolated from raw milk cheeses, which indicates the most probable
300 source of the bacteria for the product was the bovine milk.

301 The association of distinct molecular typing techniques is helpful to improve the
302 knowledge about the dynamics of infections caused by *S. aureus*. The combination of PFGE
303 with PCR is an important tool for epidemiological diagnosis as well as to understand the
304 patterns of pathogen transmission and sources of possible food contamination (Said et al.,
305 2010).

306

307 CONCLUSIONS

308 The presence of *S. aureus* above the limit established by law and at levels compatible
309 to the production of enterotoxins in artisanal raw milk cheeses points to the potential risk to
310 public health. Consumption of this product is still widespread in Brazil; therefore, an effective
311 reduction of contamination levels could be achieved by improving sanitation and hygiene
312 procedures.

313 The consumption of artisanal raw milk cheese should be considered a potential risk of
314 foodborne disease because genes coding for enterotoxin production were detected. The
315 identification of enterotoxins, other than of the classics ones, highlights the importance of
316 expanding research to detect these virulence factors for food safety assurance.

317 The combination of genotypic and phenotypic methods used helps to trace the origin of
318 the strains. The virulence pattern observed in most of the isolates lead us to conclude that the
319 contamination of traditional and artisanal raw milk cheese with *S. aureus*, despite of the
320 handmade production, is probably of animal origin. Therefore, milk pasteurization, as
321 recommended by the supervisory agencies, should solve most of the problem.

REFERENCES

- 322
- 323 Aarestrup, F. M., H. D. Larsen, N. H. Eriksen, C. S. Elsberg, and N. E. Jensen. 1999. Frequency
 324 of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A
 325 comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. APMIS.
 326 107:425-430. doi:10.1111/j.1699-0463.1999.tb01576.x.
- 327 Aires de Sousa, M., C. E. Parente, O. Vieira-Da-Motta, I. C. Bonna, D. A. Silva, and H. de
 328 Lencastre. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine,
 329 ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl. Environ.
 330 Microbiol. 73:3845-3849. doi:10.1128/AEM.00019-07.
- 331 André, M. C. D. P. B., M. R. H. Campos, L. J. Borges, A. Kipnis, F. C. Pimenta, and A. B.
 332 Serafini. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine
 333 milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following
 334 *SmaI* digestion. Food Control. 19:200-207. doi:10.1016/j.foodcont.2007.03.010.
- 335 ANVISA. 2014. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-
 336 DTA. <http://www.portal.saude.gov.br>.
- 337 Araújo, J. M., M. Galdino, and S. M. Amaral. 2011. MRSA de origem comunitária. Resid. Ped.
 338 1:39-40.
- 339 Argudin, M. A., M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio. 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus*
 340 *aureus* Enterotoxins. Toxins. 2:1751-1773. doi:10.3390/toxins2071751.
- 341 Aydin, A., M. Sudagidan, and K. Muratoglu. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins,
 342 toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the
 343 Marmara Region of Turkey. Int. J. Food Microbiol. 148: 99–106. doi:
 344 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.007.
- 345 Balaban, N., and A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 61: 1-
 346 10. doi:10.1016/S0168-1605(00)00377-9.

- 347 Baumgartner, A. 2008. Outbreaks with microbial contaminated foodstuffs in Switzerland 1994-
348 2006. Bull. Swiss Federal Off. Public Health. 32:562-568.
- 349 Bennett, R. W., and G. A. Lancette. 2001. *Staphylococcus aureus*. In Bacteriological Analytical
350 Methods. Chapter 12. Food and Drug Administration.
351 <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>.
- 352 Bianchi, D. M., S. Gallina, A. Bellio, F. Chiesa, T. Civera, and L. de Castelli. 2013. Enterotoxin
353 gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. Lett.
354 Appl. Microbiol. 58:190-196. doi: 10.1111/lam.12182
- 355 Brasil. 2001. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento
356 Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa
357 do Brasil, Brasília, DF.
- 358 Burnside, K., A. M. Lembo, M. de Los Reyes, A. Iljuk, N. T. Binhtran, J. E. Connelly, W. J.
359 Lin, B. Z. Schmidt, A. R. Richardson, F. C. Fang, W. A. Tao, and L. Rajagopal. 2010.
360 Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a
361 serine/threonine kinase and phosphatase. Plos One. 5:e11071. doi:
362 10.1371/journal.pone.0011071
- 363 Carriço, J. A., F. R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N. G. Sousa, N. Frazao, H. de Lencastre, and J.
364 S. Almeida. 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and
365 subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin.
366 Microbiol. 43:5483-5490. doi:10.1128/JCM.43.11.5483-5490.2005.
- 367 Cha, J, S. B. Vakulenko, and S. Mobashery. 2007. Characterization of the b-lactam antibiotic
368 sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from Methicillin-Resistant
369 *Staphylococcus aureus*. Clin. Biochem. 46:7822-7831.

370 Chalita, M. A. N., R. O. P. Silva, R. H. V Petti, and C. R. L. Silva. 2009. Algumas considerações
371 sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. Inf. Econ.
372 39:77-88.

373 Chung, M. L. H., P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires De Sousa, and T. Camou.
374 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel
375 electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical
376 protocols and MRSA strains. Microb. Drug Resist. 6:189-198.

377 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for
378 Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-fifth Informational Supplement. CLSI document
379 M100- S25. Wayne: PA.

380 Daka D, G. S. Solomon, and D. Yihdego. 2012. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus*
381 isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. Ann. Clin. Microbiol.
382 Antimicrob. 17:11-26. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-11-26>.

383 Delsol, A. A., D. E. Halfhide, M. C. Bagnall, L. P. Randall, V. I. Enne, M. J. Woodward, and
384 J. M. Roe. 2010. Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant
385 (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. Int. J. Food Microbiol. 140:249-
386 253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.023.

387 Dorigon, C. 2010. O Mercado Informal dos Produtos Coloniais da Região Oeste de Santa
388 Catarina. V ENEC - Encontro Nacional de Estudos do Consumo I Encontro Luso-Brasileiro de
389 Estudos do Consumo Tendências e ideologias do consumo no mundo contemporâneo.
390 http://estudosdoconsumo.com.br/wpcontent/uploads/2010/09/1.3-_Clovis_Dorigon1.pdf

391 ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union
392 summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks
393 in 2013. EFSA J.13:162.

- 394 Ertas, N., Z. Gonulalan, Y. Yildirim, and E. Kum. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus*
 395 enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int. J. Food*
 396 *Microbiol.* 15:74-77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.002.
- 397 Evêncio-Luz, L., J. V. Lima-Filho, J. Evêncio-Neto. 2012. Occurrence of *Salmonella* sp. and
 398 coagulase-positive *Staphylococci* in raw eggs and coalho cheese: Comparative study between
 399 two cities of Brazil's northeast. *Braz. J. Microbiol.* 43:1463-1466.
- 400 Gücükoğlu, A., T. O. Kevenk, T. Uyanik, Ö. Çadirci, G. Terzi, and M. Alişarlı. 2012. Detection
 401 of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR.
 402 *J. Food Sci.* 77:M620-M623. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02954.x.
- 403 Holtfreter, S., D. Grumann, M. Schmudde, H. T. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K.
 404 Kopron, J. Kolata, S. Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W. Witte, and B. M. Bröker. 2007. Clonal
 405 distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*
 406 45:2669-2680. doi:10.1128/JCM.00204-07.
- 407 Hu, S. K., S. Y. Liu, W. F. Hu, T. L. Zheng, and J. G. Xu. 2013. Molecular biological
 408 characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food. *Eur. Food Res. Technol.* 236:285–
 409 291. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1887-4>.
- 410 Ikeda, T., N. Tamate, K. Yamaguchi, and S. Makino. 2005. Mass outbreak of food poisoning
 411 disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ.*
 412 *Microbiol.* 71:2793–2795. doi:10.1128/AEM.71.5.2793-2795.2005.
- 413 Jamali, H., M. Paydar, B. Radmehr, S. Ismail, and A. Dadrasnia. 2015. Prevalence and
 414 antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products.
 415 *Food Control.* 54: 383-388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.013>.
- 416 Jarraud, S.; C. Mougél, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne,
 417 and F Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background,

418 virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70:631–641.
 419 doi:10.1128/IAI.70.2.631-641.2002.

420 Jørgensen, H.J., T. Mørk, D. A. Caugant, A. Kearns, and L. M. Rørvik. 2005. Genetic variation
 421 among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl. Environ. Microbiol.*
 422 71, 8352–8361. doi:10.1128/AEM.71.12.8352-8361.2005.

423 Lee, M., E. Shin, and Y. Lee. 2014. Antimicrobial Resistance and Integron Profiles in
 424 Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:988-997.
 425 doi: 10.1089/fpd.2014.1795.

426 Liu, Y., W. Chen, T. Ali, R. Alkasir, J. Yin, G. Liu, and B. Han. 2014. Staphylococcal
 427 enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells *in vitro*. *Toxins.* 6:3552-
 428 3567. doi:10.3390/toxins6123552.

429 Lo, C. W., Y. K. Lai, Y. T. Liu, R. L. Gallo, and C. M. Huang. 2011. *Staphylococcus aureus*
 430 hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -hemolysin and
 431 camp factor. *J. Invest. Dermatol.* 131:401-409. doi:10.1038/jid.2010.319.

432 Mehrotra, M., G. Wang, and W. M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for
 433 *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and
 434 Methicillin Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1035.

435 O'Brien, M., K., K. Hunt, S. McSweeney, and K. Jordan. 2009. Occurrence of foodborne
 436 pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiol.* 26:910–914.
 437 doi:10.1016/j.fm.2009.06.009.

438 Ohkura, T., K. Yamada, A. Okamoto, H. Baba, Y. Ike, Y. Arakawa, T. Hasegawa, and M. Ohta.
 439 2009. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of methicillin-resistant
 440 *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese
 441 hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* 58:1329–1336. doi:10.1099/jmm.0.010173-0.

- 442 Ostyn, A., M. L. De Buyser, F. Guillier, J. Groult, B. Felix, S. Salah, G. Delmas, and J. A.
 443 Hennekinne. 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal
 444 enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveill.* 15:19528.
- 445 Rosengren, A., A. Fabricius, B. Guss, S. Sylvén, and R. Lindqvist. 2010. Occurrence of
 446 foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on
 447 farm-dairies. *Int. J. Food Microbiol.* 144:263-269. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004.
- 448 Saadat, Y. R., A. A. I. Fooladi, R. Shapouri, M, M, Hosseini, Z, D, Khiabani, 2014. Prevalence
 449 of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*, in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. *Iran. J.*
 450 *Microbiol.* 6:345-349.
- 451 Said, K. B., J. Ismail, J. Campbell, M. R. Mulvey, A. Bourgault, S. Messier, and X. Zhao. 2010.
 452 Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus*
 453 *aureus* lineage in Canada by use of clumping factor, a pulsed-field gel electrophoresis, and *spa*
 454 typing. *J. Clin. Microbiol.* 48:375-386. doi:10.1128/JCM.01768-09.
- 455 Schneider, R. N., A. Nadvorny, and V. Schmidt. 2009. Perfil de resistência antimicrobiana de
 456 isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção
 457 de suínos. *Biotemas.* 22:11-7.
- 458 Silva, E. R., T. R. M. Silva, A. M. G. Pereira, A. C. Machado, and K. R. Santoro. 2012.
 459 Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina
 460 subclínica. *Acta Vet. Brasilica.* 6:118-123.
- 461 Spanu, V., C. Scarano, F. Cossu, C. Spanu, and E. P. L. de Santis. 2014. Antibiotic resistance
 462 traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese.
 463 *J. Food Sci.* 79:M2066-M2071. doi:10.1111/1750-3841.12590.
- 464 Tenover, F. C., R. D Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. A. Murray, D. H. Persing, and
 465 B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by

- 466 pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-
467 39.
- 468 Tondo, E. C., M. C. Guimarães, J. A. Henriques, and M. A. Ayub. 2000. Assessing and
469 analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using
470 antibiotic resistance and PFGE. Can. J. Microbiol. 46:1108-14.
- 471 Vitale, M., M. L. Scatassa, C. Cardamone, G. Oliveri, C. Piraino, R. Alduina, and C. Napoli.
472 2015. Staphylococcal Food Poisoning Case and Molecular Analysis of Toxin Genes in
473 *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Food in Sicily, Italy. Foodborne Pathog. Dis.
474 12:21-23. doi:10.1089/fpd.2014.1760.
- 475 Wallin-Carlquist, N., D. Marta, E. Borch, and P. Råadström. 2010. Prolonged expression and
476 production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. Int. J. Food
477 Microbiol. 141:69 –74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.028.
- 478 Xu, J., C. Shi, M. Song, X. Xu, P. Yang, G. Paoli, and X. Shi. 2014. Phenotypic and genotypic
479 antimicrobial resistance traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai. J.
480 Food Sci. 79:M635–M642. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12405>.
- 481 Xu, S. X., and J. K. McCormick. 2012. Staphylococcal superantigens in colonization and
482 disease. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:1-11. doi:10.3389/fcimb.2012.00052.
- 483 Zschock M., B. Kloppert, W. Wolter, H. P. Hamann, and C. Lammler. 2005. Pattern of
484 enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine
485 mastitis. Vet. Microbiol. 108:243 – 249. doi:10.1016/j.vetmic.2005.02.012.
- 486

487 Table 1. Primers used in multiplex PCR reactions for virulence genes detection

Primers	Sequence (5' – 3')	bp	Reaction
TSST F	TTCACTATTTGTAAAAGTGT CAGACCCACT	180	I
TSST R	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT		
SEC F	GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	297	
SEC R	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT		
SEB F	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	404	
SEB R	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT		
SEI F	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	
SEI R	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
SEO F	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	180	II
SEO R	ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC		
SEJ F	TAACCTCAGACATATATACTTCTTAACG	300	
SEJ R	AGTATCATAAAGTTGATTGTTTTCATGCAG		
SEE F	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	
SEE R	CACCTTACCGCCAAAGCTG		
ETB F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612	
ETB R	AGTGAAC TTATCTTTCTATTGAAAAACACTC		
ETA F	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	190	III
ETA R	TGGTACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC		
SEM F	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	326	
SEM R	TTCAGTTTCGACAGTTTTGTGTGCAT		
SED F	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	492	
SED R	GCTGTATTTTTCCTCCGCTAAATAATATG		
SEG F	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	
SEG R	AAACTTATATGGAACSSSSGGTACTAGTTC		
HLA F	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	IV
HLA R	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
HLB F	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309	
HLB R	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
SEH F	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	376	
SEH R	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
SEA F	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	560	
SEA R	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC		
SEN F	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	680	
SEN R	AACTCTGCTCCCACTGAAC		

488 Fonte: Jarraud et al., 2002

490 Table 2. Antimicrobial susceptibility profile of *S. aureus* isolated from artisanal raw milk
 491 cheeses sold in Brazilian street fairs

Samples isolates ¹	Susceptibility profile ²	Phenotype
Q3 ₂ ; Q12 ₂ ; Q12 ₃ ; Q15 ₂ ; Q18 ₁ ; Q18 ₃ ; Q34 ₃ ; Q35 ₂ ; Q35 ₃ ; Q35 ₄ ; Q44; Q45	SSSSSSSSS ³	A
Q9 ₂ ; Q9 ₃ ; Q14; Q15 ₃ ; Q24 ₃ ; Q36; Q46; Q49; Q56	RSSSSSSSS	B
Q34 ₂ ; Q35 ₁ ;	SSSSSSSIS	C
Q3 ₁	SSSSSRSSS	D
Q17	SSSSSSSSI	E
Q27	RSSSSRSIS	F
Q24 ₂	RSSSSSIS	G
Q11	RSSSISSIS	H
Q54	RSSSSRSSS	I

492 ¹ Q – Raw milk cheese;

493 ² (R) Resistance; (I) Intermediate susceptibility; Susceptibility (S).

494 ³ Sequence of antimicrobials tested: penicillin, cefoxitin, trimethoprim/sulfamethoxazole,
 495 rifampim, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, quinupristin/dalfopristin, clindamycin.

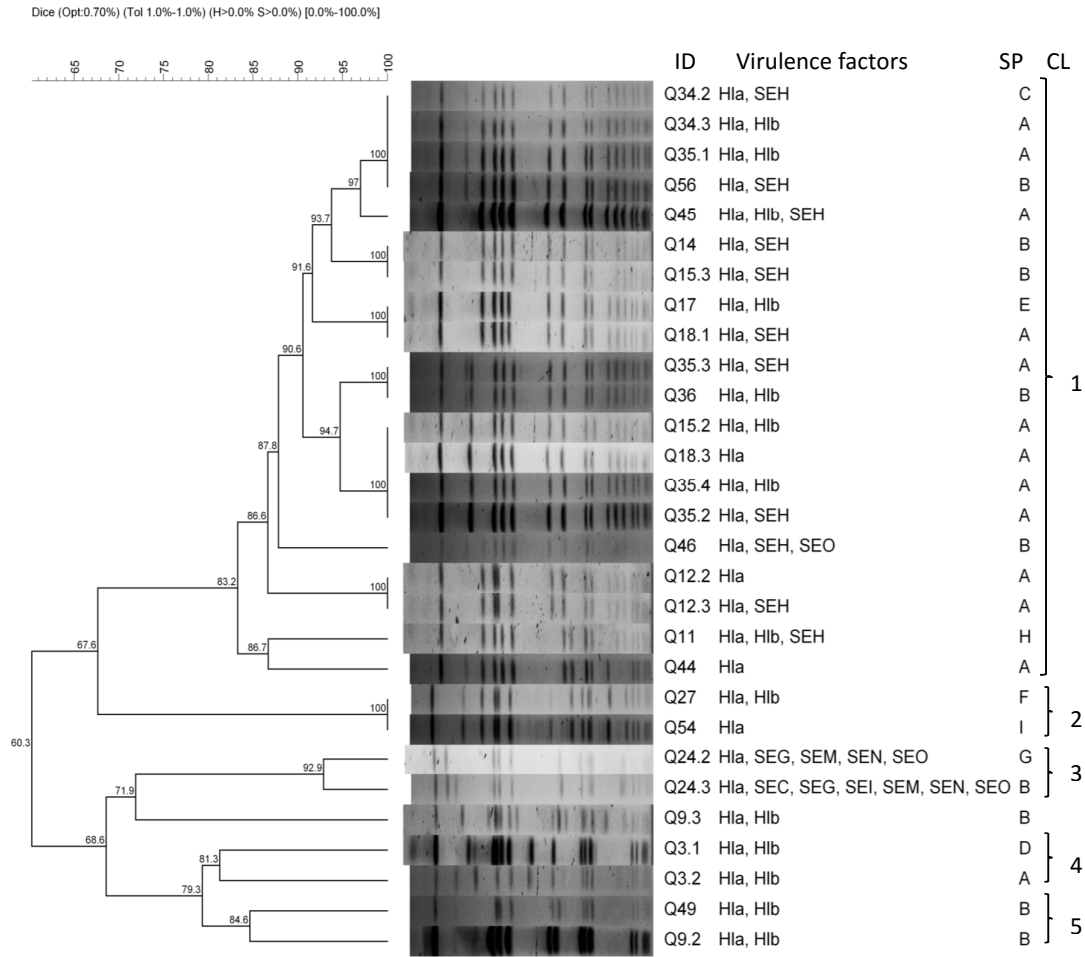
496

497 Table 3. Virulence genes detected in *S. aureus* isolated from artisanal raw milk cheeses sold in
 498 Brazilian street fairs

Sample isolates	Virulence genes
Q3 ₁ ; Q3 ₂ ; Q9 ₂ ; Q9 ₃ ; Q15 ₂ ; Q17; Q27; Q34 ₃ ; Q35 ₁ ; Q35 ₄ ; Q36; Q49	<i>hla+hlb</i>
Q11; Q45	<i>hla+hlb+seh</i>
Q12 ₃ ; Q14; Q15 ₃ ; Q18 ₁ ; Q34 ₂ ; Q35 ₂ ; Q35 ₃ ; Q56 ₂	<i>hla+seh</i>
Q24 ₂	<i>hla+seg+sem+sen+seo</i>
Q24 ₃	<i>hla+sec+seg+sei+sem+sen+seo</i>
Q46	<i>hla+seh+seo</i>
Q12 ₂ ; Q18 ₃ ; Q44; Q54	<i>hla</i>

499

Ferreira et al., Figure 1



519 Figure 1: Clonal relationships, virulence and susceptibility profile of *S. aureus* isolated from
520 raw milk cheese, established with *Sma*I PFGE analysis.
521 ID: sample identification; SP: Susceptibility Profile; Cl: Cluster; Hla: Hemolysin A; Hlb:
522 Hemolysin B; SE: Staphylococcal Enterotoxin

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os queijos do tipo Minas frescal, artesanais e industriais, comercializados no município de Goiânia, Goiás, apresentaram-se em sua maioria com contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do preconizado pela legislação brasileira e podem representar um risco para a saúde do consumidor. Esse resultado sugere principalmente falha no controle higienicossanitário na cadeia de produção e manipulação.

Os queijos de produção artesanal, elaborados a partir de leite cru, apresentaram maior contaminação do que os queijos de produção industrial, com confirmação da bactéria patogênica *S. aureus* acima da contagem permitida pela legislação, em níveis propícios para a produção de enterotoxinas, que também foram detectadas em quantidade significativa das amostras. Confirmou-se, portanto, a importância de se estabelecer normas com fiscalização eficiente através de legislação para os queijos de produção artesanal, assim como a necessidade de sensibilizar os produtores sobre a relevância de se estabelecer melhorias e medidas sanitárias para controlar o processo de produção.

Foi possível identificar até quatro isolados diferentes em uma mesma amostra, evidenciando que a contaminação do queijo, pode ocorrer de várias fontes durante a cadeia de produção e manipulação e contaminação prévia da matéria prima no momento da ordenha. Este fato poderia ser minimizado se cuidados com a higiene no processamento fosse intensificado com o objetivo de prevenir a contaminação cruzada entre as diversas fontes potenciais de bactérias para o produto.

Além disso, observou-se nos locais de venda condições higiênicas precárias nas feiras, como falhas na limpeza local, queijos expostos sem refrigeração, sem embalagem propícia para o produto e presença de moscas. Foi observado que os vendedores não utilizavam luvas, aventais ou toucas. O que evidencia que a contaminação também pode ocorrer no momento da venda e reforça a necessidade de inspeção pela vigilância sanitária nestes locais.

Por serem comercializados com a ausência de embalagens e rótulos, não foi possível identificar os fornecedores e relatar se queijos com cepas semelhantes são oriundos de um mesmo local.

Os resultados confirmaram que se faz necessária a vigência de legislação no comércio de produtos sem controle de qualidade de produção e sem fiscalização, uma vez que a qualidade demonstrada pelos produtos artesanais é inferior aos produtos industrializados inspecionados por órgão fiscalizador e coloca em risco a saúde do consumidor.

ANEXOS

ANEXO A – Relação de feiras livres existentes em Goiânia, Goiás.

SECRETARIA MUNICIPAL DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
 Av. Atílio Correia Lima, 1.120, Cid. Jardim - CEP 74405-030 Goiânia/GO - fone 3524-2103
 Divisão de habilitação e Controle de Feiras Livres e Cepal

FEIRAS LIVRES EM GOIÂNIA

SEGUNDA-FEIRA (02 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço
002	SETOR FAMA	Diurna	Rua 27, qds. 10 e 11, esq. c/ R. 3
176	RESID PORTAL DO SOL	Noturna	Av. Santa Bárbara

TERÇA-FEIRA (17 feiras)

	Setor	Horário	Endereço
004	DOM BOSCO	Diurna	Rua 29, esq. c/ R. 1 e R. 4, Setor Oeste
005	CASTELO BRANCO	Diurna	Rua 55, entre Qds. 10 e 13
003	CEPAL VILA ABAJÁ	Diurna	Rua Benjamim Constant, esq. c/ R. 5 e Marginal Sul
007	CONJUNTO RIVIERA	Diurna	Av. da Liberdade com rua 14
061	BAIRRO JOÃO VAZ	Diurna	Av. Rio Branco, entre Qds. 20 e 24
006	NOVA SUIÇA	Noturna	Av. T-13 com rua T-5 e T-38
009	VILA LUCY	Noturna	Av. B, entre Av. Araxá e Av. A
065	GOIÂNIA II	Noturna	Av. Frei Nazareno Confaloni, entre Qds. 26 e 30
083	PQ. OESTE INDUSTRIAL	Noturna	R. Egerineu Teixeira, entre R. Petróleo e R. Amianto, Qd. 148
098	JARDIM PRIMAVERA	Noturna	Rua CP – 33 Qd. 71, 67
111	PQ. ANHANGUERA III	Noturna	Rua Riachuelo com Getúlio Vargas
125	JARDIM BELA VISTA	Noturna	Av. Bela Vista, em frente à Qd. I
133	PQ. TREMENDÃO	Noturna	Rua I, Qd. 141
140	JARDIM LIBERDADE	Noturna	Av. da Divisa c/ Av. do Povo
141	SANTOS DUMONT	Noturna	Av. Efraim de Moraes
150	VILA MORAIS	Noturna	Rua 12 Qd. 05 e 06
173	JARDIM ABAPORU	Noturna	Rua Tivoli com Rua Livorno, Qd. 09

QUARTA-FEIRA (18 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço
008	BAIRRO GOIÁ	Diurna	Av. Felipe Camarão, qds. 38 e 39
010	PARQUE AMAZONAS	Diurna	Praça José Rodrigues de Moraes Filho, qds. 197 e 198
011	JARDIM NOVO MUNDO	Diurna	Rua Estádio Califórnia, qd. 136
012	CRIMÉIA OESTE	Diurna	Rua João Alves de Castro, qd. 20, Praça Dom Prudêncio
013	VILA CANAÃ	Diurna	Av. Aderup, c/ Av. Nedemeyer, entre qds. 217 e 221
014	VILA NOVA	Diurna	Décima avenida, entre qds. 46 e 66
015	SETOR COIMBRA	Diurna	Av. Perimetral, entre T-1 e T-6
016	CEPAL SETOR SUL	Diurna	Rua 115 esquina com Av. Fued José Sebba
018	CJ. VERA CRUZ II	Diurna	Av. Gercina Borges Teixeira, etapa II, qds. C-148 e C-149
123	VILA SÃO PAULO	Diurna	Av. São Clemente
064	URIAS MAGALHÃES	Noturna	Rua Rondônia, lt. 08, qd. D até qd. 12
089	JD. NOVA ESPERANÇA	Noturna	Rua São Geraldo, entre qds. 136 e 150
100	ST. PEDRO LUDOVICO	Noturna	Rua Couto Magalhães
117	JARDIM GUANABARA I	Noturna	Rua Canoeiro, qd. 86
128	RECANTO DO BOSQUE	Noturna	Av. Goiás com Tropical
129	PQ. IND. JOÃO BRAZ	Noturna	Avenida Brasil
130	JD. MARILIZA	Noturna	Av. Aristóteles
174	MADRE GERMANA II	Noturna	Rua Sinhá Vasconcelos, Qd. 54 Lt. 44

QUINTA-FEIRA (19 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço
019	CEPAL JARDIM AMÉRICA	Diurna	Praça C-108 entre Rua 105, 115 e C-01
020	SETOR AEROPORTO	Diurna	Rua 11 –A, entre qds. 15 –A e 22 - A
021	SETOR CENTRO OESTE	Diurna	Rua 510 com rua P - 25
022	SETOR UNIVERSITÁRIO	Diurna	Rua Uberaba com rua 307, entre qds. 1 e 116
023	BAIRRO CAPUAVA	Diurna	Rua Tomaz Gonzaga, entre qds. 20 e 26
024	JARDIM PLANALTO	Diurna	Av. Marco Polo, entre qds. 41 e 51
025	CJ. VERA CRUZ I	Diurna	Av. Gercina Borges Teixeira c/ R. Heliézer, qds. C-16 e C-17
124	JARDIM CURITIBA I	Noturna	Praça do CAIC

060	CIDADE JARDIM	Noturna	Rua dos Ferroviários c/ R. Santarrona, qd. H, lt. 16
066	MODELO	Noturna	Rua 68 c/ rua 77, qd. 144, setor Central
067	JARDIM NOVO MUNDO	Noturna	Rua Maldonado, qds. 229 a 231
070	CJ. MONTE CARLO	Noturna	Rua MC – 6, qds. 5 a 7
084	CONJUNTO VILA BELA	Noturna	Rua Jequitibá, frente à Av. Flemington
094	SOLAR VILLE	Noturna	Rua Higino Pereira Martins
097	BALNEÁRIO MEIA PONTE	Noturna	Av. Ormazena Neves Machado, entre qds. 70 e 75
137	SANTA GENOVEVA	Noturna	Av. das Indústrias
143	ST. NEGRÃO DE LIMA	Noturna	Rua Comendador Negrão de Lima
170	RESIDENCIAL FORTEVILLE	Noturna	Av. das Seringueiras, s/n Qda. 20

SEXTA-FEIRA (19 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço:
026	SETOR SUDOESTE	Diurna	Praça C-8, C-12 com C-15
027	CRIMÉIA LESTE	Diurna	Av. Couto Magalhães, qd. G, com qd. L
028	VILA SÃO JOSÉ	Diurna	Rua Dom Prudêncio, entre qds. 355 e 542
029	DOM BOSCO	Diurna	Rua 29, esq. com R. 1 e R. 4, Setor Oeste
030	RUA IPAMERI	Diurna	Rua Ipameri, entre qds. 109 e 133
031	BAIRRO FELIZ	Diurna	Rua 810 c/ rua 823, entre qds. 937 e 939
062	JARDIM PRESIDENTE	Noturna	Rua Presidente Lincoln, qd. 51
063	VILA REGINA	Noturna	Rua São Miguel, c/ rua Monte Olívia e rua Patriarca, qd. 27
068	JD. DOM FERNANDO I	Noturna	Av. 27 de Janeiro, qds. 12, 14 e 15
069	VILA FINSOCIAL	Noturna	Rua VF-65 c/ rua VF-102
076	CHÁC. DO GOVERNADOR	Noturna	Rua DF-2, entre qds. DF-17 e DF-20
093	JD. GUANABARA II	Noturna	Av. GB-5, entre Gb-7 e GB –3
115	SETOR FAIÇALVILLE	Noturna	Rua F-21 c/ Ismerino de Carvalho
122	JARDIM NOVO MUNDO	Noturna	Rua Landriana c/ Av. Uruguaiana
131	ESTRELA DALVA	Noturna	Rua 16 de Maio c/ 4 de Julho
132	BAIRRO SÃO CARLOS	Noturna	Av. Comercial, qd. 15
135	MORADA DO SOL	Noturna	Praça Antares.
136	GOIÂNIA VIVA	Noturna	Rua Gv-10 c/ GV-09
159	HUGO DE MORAIS	Noturna	Rua Felizarda Silva Moraes

SÁBADO (22 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço
032	JARDIM NOVO MUNDO	Diurna	Rua Alegrete c/ rua Joinville, entre qds. 38 e 45
033	PQ. IND. JOÃO BRAZ	Diurna	Av. Berlim com rua Oriente
035	PQ. LARANJEIRAS	Diurna	Rua C-2A fim ruas C2A/C4
036	CEPAL DO SETOR SUL	Diurna	Rua 115 com Av. Fued José Seba.
037	SETOR BUENO	Diurna	Rua T-49, com Av. T-1
038	NOVO HORIZONTE	Diurna	Av. Domiciano Peixoto
039	CIDADE JARDIM	Diurna	Av. Dom Emanuel
040	SETOR FAMA	Diurna	Av. Marechal Rondon com Rua 3, qd. 11
041	CONJ. ITATIAIA	Diurna	Rua R-11
059	FINSOCIAL	Diurna	Rua VF-52
118	GUANABARA III	Diurna	Av. Goiânia
119	JARDIM AMÉRICA	Diurna	Praça C-170 Qd. 397.
121	PQ. DOS BURITIS	Diurna	Rua João M. qd. 06
134	PQ. SANTA RITA	Diurna	Av. Babaçu c/ Av. América do Brasil
139	JARDIM LAGEADO	Diurna	Rua Hilário Sebastião
078	BAIRRO SÃO FRANCISCO	Noturna	Rua Rocha Pombo, entre qds. 33 e 40
081	BAIRRO GOIÁ	Noturna	Av. Felipe Camarão, entre qds. 16 e 23
095	RES. ALPHAVILLE	Noturna	Rua Alfa-15
114	ST. NOVO PLANALTO	Noturna	Rua da Divisa, qd. 89/84
138	SETOR PROGRESSO	Noturna	Av. Timbiras com João Damasceno
142	JARDIM POMPÉIA	Noturna	Rua Diamantina
157	JARDIM DAS AROEIRAS	Noturna	Av das Aroeiras

DOMINGO (19 feiras)

Cód.	Setor	Horário	Endereço
042	CONJUNTO RIVIERA	Diurna	Av. da Liberdade
043	JARDIM GUANABARA	Diurna	Av. Contorno, qd.37-A
044	VILA PEDROSO	Diurna	Rua 2 Qd. K
045	CONJ. VERA CRUZ I	Diurna	Av. Gercina Borges Teixeira com rua Heliézer
046	CONJ. VERA CRUZ II	Diurna	AV. Gercina Borges Teixeira
047	JD. NOVA ESPERANÇA	Diurna	Av. Sol Nascente

048	URIAS MAGALHÃES	Diurna	Av. Francisco Bibiano entre Av. Central, qd. 53
049	BALNEÁRIO MEIA PONTE	Diurna	Av. Circular
050	SETOR UNIVERSITÁRIO	Diurna	11ª Avenida
051	VILA REDENÇÃO	Diurna	Praça do Comércio, qd. C-1
052	SETOR PALMITO	Diurna	Av. Cristóvão Colombo, qds. 212 e 213
053	ST. PEDRO LUDOVICO	Diurna	Pça. Isidória de Almeida Barbosa
054	CEPAL JARDIM AMÉRICA	Diurna	Pça C-108 entre a rua C-105, rua C-115 e Av. C-1
055	VILA NOVA	Diurna	Av. Nona Avenida entre 5ª Avenida e Rua 207
056	SETOR UNIÃO	Diurna	Rua U-55
057	SETOR CENTRO-OESTE	Diurna	Rua P-25 c/ Rua 510 e 509 – Qd. 21
077	BAIRRO DA VITORIA	Diurna	Av. Comercial
082	CJ. PARQUE ATHENEU	Diurna	Rua 2.013, unidade 2.001
116	JARDIM LIBERDADE	Diurna	Rua Transversal
126	JARDIM PRIMAVERA	Diurna	Av. Central c/ Rua JP

TOTAL: 116 FEIRAS.

ANEXO B – Normas para autores do periódico Journal of Dairy Science

Guide for Authors

Editorial Policies and Procedures

The American Dairy Science Association® (ADSA®) invites scientists from the global community to submit papers for consideration to the Journal of Dairy Science. Authors need not be members of ADSA.

These instructions detail the form and style required by the Journal of Dairy Science (JDS) for papers submitted for publication. Papers that do not follow the form and style of the journal may be rejected without review. It is recommended that authors refer to these instructions when preparing manuscripts, when incorporating requested changes into revisions after review, and when checking author proofs.

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in chief, Dr. Matthew C. Lucy; phone: (573) 882-9897; e-mail: lucym@missouri.edu.

For assistance with Manuscript Central, Manuscript Submission/Copyright forms, and page charge/offprint orders contact Shauna Miller, Editorial Assistant, Headquarters Office, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; FAX (217) 378-4083; shaunam@assoqh.org.

For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, Managing Editor, Headquarters Office, American Dairy Science Association, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; phone (217) 356-7641; FAX (217) 378-4083; journals@assoqh.org.

Care and Use of Animals

All research animals should be acquired, retained, and used in compliance with federal, state, and local laws and regulations. The authors should state explicitly that IACUC (or equivalent) approval was obtained before commencement of the study. Authors should make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments should be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd ed. (available from Federation of Animal Science Societies, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820, <http://www.fass.org/>). Methods of killing experimental animals must be described in the text. When describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified.

Human Subjects Research

If human subjects were involved in research (e.g., surveys, sensory panels, or other participation), the authors certify that the studies complied with all appropriate laws, regulations, and policies governing the use of human subjects in research.

Authorship

The Journal of Dairy Science follows the guidelines for authorship from the International Committee for Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining->

the-role-of-authors-and-contributors.html). As such, the journal recommends that authorship be based on the following 4 criteria:

1. Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
2. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
3. Final approval of the version to be published; AND
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

To satisfy the requirement for authorship, each contributor must meet all 4 criteria above. Contributors meeting fewer than the 4 criteria listed here should be listed in the Acknowledgments section of an article.

Types of Articles

Full-Length Research Papers. The majority of papers published in JDS are full-length research articles. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts and methods, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in the journal must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

In addition to full-length research papers, the following types of articles appear in the journal:

Our Industry Today. The Our Industry Today section includes interpretive applied summaries and recommendations from research that are useful to the dairy industry. Syntheses and applications from technical reports that contribute to solutions of problems in the dairy industry especially are solicited. Authors of reports for extension education of the nonscientist are encouraged to share their contributions with colleagues and to achieve larger circulation of their conclusions and recommendations through this section. In addition, papers that report on advances in teaching and outreach techniques are suitable for this section. The organization of papers for Our Industry Today may vary but should be logical and effective; an abstract is required. All other style and form instructions apply.

Hot Topics. Papers submitted for this section must report on a completed experiment testing a timely, original hypothesis of importance to an area of dairy science. The work may be preliminary in nature, but with sufficient data so that the hypothesis is clearly tested. Results may point to avenues for fruitful, indepth analyses. Reports must contain an explicitly stated hypothesis and objectives, with sufficient detail in methodology for repetition of the work, as well as a results section, a brief discussion, and references. Total page limits for text, tables, figures, and references must be no more than 4 journal pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). The manuscript should contain a title and short abstract but not separate sections. The total number of tables and figures should be no more than 3; references should be minimal. The first page must have HOT TOPICS in capital letters on the header line.

These papers will be given priority for publication. An effort will be made to notify authors of a decision within 1 mo of the date of receipt. Once accepted, the paper should be published within 3 mo.

Short Communications. Short communications are reports of limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance to some area of dairy science. The manuscript should be no more than 4 journal pages in length (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures); "Short communication:" should precede the title on the title page of the manuscript. Short communications should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity. The manuscript may report negative results. Reports must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.

Technical Notes. Papers in this section should report a method that is useful to some aspect of dairy science. Submissions should include a brief justification for the technique, be it new or an improvement on a previously published technique. The report should state a hypothesis, include a full description of procedures that can be repeated by researchers, and include explicit controls to indicate sensitivity, precision, and accuracy of the technique. Technical notes should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity.

If the technique is an improvement on an existing technique, sufficient comparison of the previous technique should be included, and mean and dispersion information must be included. The page limit is 4 printed pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). Use of tables, figures, and references should be minimized. Requests for longer technical notes may be made to the senior editor and editor-in-chief, but justification for a longer report will be required.

Invited Reviews. The mechanism for consideration of invited reviews is to encourage additional publication (approximately 10 to 12 per year) of invited reviews in all sections of the journal. Section editors will advise the editor-in-chief on suggested reviewers and justification for the review. The editor-in-chief will make the invitation and the invited reviews editor will ensure the quality of the review. The first 10 printed pages of an invited review are published at no cost to the author.

Authors of symposium papers and invited papers presented at the joint annual meeting of ADSA/American Society of Animal Science may be selected to contribute invited review papers.

Letters to the Editor. Short (300 words) letters to the editor on topics of concern to readers, including comment on publications with rebuttals from authors if needed, may be submitted to the editor-in-chief or to any of the editors. The letters should be titled, and the title and running head should include "Letter to the editor." Letters will be published at the discretion of the editor-in-chief. Authors of letters are subject to the same copyright release requirements as other authors. Letters are published at no charge to the author(s).

Biographical Sketches. Occasionally, retiring or past scientists and educators should be subjects of biographical essays, both as a small honor to them and as an example and history for other readers. This section brings a sense of maturity and completeness

to our field. Individuals who wish to submit biographical sketches should contact the editor-in-chief or one of the editors for additional instructions.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online at Manuscript Central (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Detailed instructions for submitting electronically are provided online (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Authors who are unable to submit online should contact Shauna Miller, Editorial Assistant, American Dairy Science Association, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820 (shaunam@assoqh.org).

Copyright Agreement

Data (including graphs, figures, tables, and illustrations) must not have appeared in print elsewhere except as abstracts, local or regional field day reports, extension letters, or non-peer-reviewed, noncopyrighted proceedings of conferences. Material submitted to JDS should not be submitted for publication to popular magazines, company advertisements, or organizational proceedings until the author has received notification of acceptance of the manuscript. Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review, and the senior author should have authorization to publish. All coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

The Manuscript Submission and Copyright Release Form (published in issues of the journal and available from the journal web site:<http://www.journalofdairyscience.org/>) should be submitted for each paper; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form; manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of all coauthors. Authors who are not permitted to release copyright must still return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

Requests to reproduce material published in JDS must be made through Elsevier's Rights Department (healthpermissions@elsevier.com), online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>), or via the Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com>). The Association grants to the authors the right of republication of their own material in any book, thesis, or dissertation of which they are authors or editors subject only to giving proper credit in the book to the original JDS publication and only for non-commercial use. In addition, authors may post abstracts of manuscripts on the web at the time of submission. Once an author receives notification of acceptance, the peer-reviewed, pre-typesetting manuscript can be posted to the author's website. Authors may deposit their peer-reviewed, pre-typesetting manuscript into a repository upon payment of the open access fee (see Open Access section of these instructions). For more information, read the "Terms and Conditions" pages at <http://www.journalofdairyscience.org/>.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Upon submission to JDS, a manuscript is assigned to an editor, who enlists reviewers to assist in the evaluation of the manuscript. The review process is confidential, which infers a bond of trust among the authors, editor, and reviewers. The editor is trustee of

the manuscript until the review process is completed and ensures that the review process is fair, thorough, and confidential. Reviewers are asked not to share the contents of the manuscript with anyone, except that they may ask a colleague to assist with the review with approval of the editor. Communication with authors should only be through the editor. Reviewers should notify the editor of conflicts of interest that may compromise their ability to provide a fair and unbiased review. Moreover, they must recognize their responsibility in maintaining the confidential nature of the review. Authors should suggest names of appropriate reviewers when submitting the manuscript to streamline the review process and may list reviewers whom they consider unacceptable because of potential bias. These recommendations will be considered by the editor when assigning reviewers.

A reviewed paper returned to authors for revision must be returned to the editor within 6 wk. If not, the paper may be treated as a new submission. Under unusual circumstances, editors may extend the revision deadline beyond 6 wk.

Rejected Manuscripts

If a manuscript is rejected, the corresponding author may discuss the matter with the section or senior editor assigned to the manuscript. If the author believes a rejection decision was erroneous or biased, he/she may appeal the decision directly, in writing, to the editor-in-chief. The editor-in-chief will review the author's reasons, as well as all materials related to the manuscript, and will accept or deny the appeal. A rejected manuscript may be resubmitted for publication only if this course of action has been specifically recommended by the editor-in-chief.

The Journal of Dairy Science follows the guidelines of the Committee on Publication Ethics (COPE; publicationethics.org) and authors should refer to COPE for guidance on authorship and publication ethics.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded by the section editors to the editorial office for technical editing and typesetting. At this point the technical editor may contact the authors for missing information or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures reproduced, and author proofs prepared.

Proofs

Author proofs will be sent by e-mail (in PDF format) to the corresponding author. Although the proof appears in a 2-column page format, it should be considered a galley proof; page layout may change when the article is paginated into an issue. Author proofs should be read carefully and checked against the typed manuscript, because responsibility for proofreading lies with the authors. Corrections may be returned by fax, mail, or e-mail. The Comments feature in Adobe Acrobat or Adobe Reader may be used to insert changes and comments within the proof PDF. For faxed or mailed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. If extensive editing is required, corrections should be provided on a separate sheet of paper with a symbol indicating location on the proof. Changes sent by e-mail to the technical editor must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Author queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication.

Proof corrections should be made and returned to the technical editor within 3 days of receipt. Publication cannot proceed until proofs are returned. Contact a technical editor at journals@assochq.org if you have questions about the proof correction process.

Publication Costs

The Journal of Dairy Science® offers two options for publication of articles: Standard Page Charges and Open Access.

Standard Page Charges: The current charge for publication is \$85 per printed page in the journal for articles if at least one author is a professional member of ADSA. If no authors are ADSA members, the publication charge is \$140 per journal page. The cost to publish a color figure is \$650 (per figure) plus an offprint surcharge. There is charge for all offprints and reprints. An offprint order form will be sent to the corresponding author with the author proof.

Open Access: Under the new open access (OA) policy, authors may choose to pay the OA fee **in lieu of standard page charges** when author proofs are returned so that their paper becomes freely available upon publication in an online issue. The OA fee is \$1750 if at least one author is a professional member of ADSA or \$3500 if no authors are ADSA members. Open access articles will be freely accessible through the journal's web site (<http://www.journalofdairyscience.org/>) at the time of publication. All other (non-OA) articles become freely available without a subscription 12 months after publication.

Articles for Deposit: Author(s) publishing articles under open access shall bear sole responsibility for meeting the specific posting requirements of their funders. Upon payment of the OA fee, authors may deposit the accepted (peer-reviewed pre-typeset only) manuscript in a repository. The embargo period before deposit in a repository is 12 months (or as specified by the funder) after publication in a journal issue.

By signing the Manuscript Submission and Copyright Release Form at the time of submission, the authors agree to bear responsibility for payment of publication charges. Invoices for publication charges will be issued at the time an issue goes to press (approximately 2 weeks before being posted online). Payment is due within 30 days of receipt of the invoice. The preferred method of payment is by credit card, with credit card details submitted on the page charge form sent out with the author's proof. Payment may be made by check, drawn on a US bank. For payments by wire transfer, contact Vicki Paden at vickip@assochq.org. **Manuscripts will be withheld from publication for authors (and their co-authors) with past-due page charge invoice(s) until all prior payment obligations have been met.**

Page Charge Waivers

Authors who must use personal funds to pay for page charges and for whom such charges would entail hardship can request of the editor-in-chief that these charges be waived, under the following conditions: (1) the request must be made in writing to journals@assochq.org **at the time the manuscript is submitted**; (2) the request should be accompanied by a statement from a financial officer or other official from the institution with which the author is affiliated, indicating the reasons why page charges cannot be paid; and (3) if the waiver is granted, the author is expected to become a professional member of ADSA. Waivers are generally only granted to authors in

AGORA Band A countries (www.fao.org/agora/eligibility/en). Only one waiver will be granted per institution per twelve-month period. Authors who request waivers cannot order offprints.

Offprints may be ordered at an additional charge. Offprints will be shipped approximately 1 month after publication of the issue. Invoices for offprints will be sent to the author or institution shown on the page charge and offprint order form. There is a charge for all offprints.

MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM

General

Authors should prepare their manuscripts in Microsoft Word (.doc or .docx format) and upload them using the fewest files possible to facilitate the review and editing processes.

Writing Style

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in Merriam-Websters Collegiate Dictionary, 11th ed., Websters Third International Dictionary, or the Oxford American English Dictionary.

Today, most medical and scientific style manuals support the active over the passive voice. Use of the active voice results in lively, clear, and concise writing. Passive voice may still be appropriate in the Materials and Methods section, for example, where the actor is unimportant and the writer wishes to focus on the action or the recipient of the action. The active voice and first-person pronouns (I, we) should be used in the Results, Discussion, and Conclusions sections. For example, "we observed a differenceâ," "we concluded thatâ," or "Treatment A affected dry matter intakeâ" rather than "There was a differenceâ," "It was concluded thatâ," or "Dry matter intake was affected by treatment Aâ."

For scientific conventions, authors should follow the style and form recommended in Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, 8th ed., published by the Council of Science Editors in cooperation with University of Chicago Press (www.scientificstyleandformat.org/).

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be typed double-spaced (in Microsoft Word) with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. Special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType from Design Science (www.dessci.com). Note that equations created using the new Equation Builder in Microsoft Word 2007 may not be compatible with earlier versions of Word or other software used in our composition system. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Interpretive Summary

All authors of JDS papers should provide an interpretive summary (IS) of 100 words or less that has been written for nonspecialist readers. That summary should consist of a title, the first author's last name, and a summary, which must include a sentence or two

to summarize the project's expected importance, or its economic, environmental, and/or social impact (similar to the CRIS Progress Report Statement for those who must complete that form). Common abbreviations are permitted (those from the JDS Unrestricted list). The summary should appear on top of the first page of the manuscript, before the running head and title. Interpretive summaries will be peer reviewed. At publication, interpretive summaries will appear in a section at the beginning of the journal. The summaries are intended for an audience who may not be familiar with work in the author's area of expertise and for government or media researchers, and they will provide JDS readers with a brief overview of the research presented in each issue. Authors must make the summary readable by the general public. The goal is to make JDS research more visible to a wider audience and to emphasize its impact.

Headings

Major Headings. Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION), CONCLUSIONS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First Subheadings. First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. The heading is not followed by punctuation. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

Across the top of the title page (first page), indicate a running head (abbreviated title) of 45 characters or less. The running head is centered and all uppercase. Our Industry Today and Hot Topic serve as the running heads for those respective article types. Short Communications, Technical Notes, Invited Reviews, and Letters to the Editor use a running head beginning with the appropriate designation (i.e., SHORT COMMUNICATION:) followed by a short title.

The title should be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized and the remainder of the title is lowercase. The title should contain words or phrases used for indexing the article.

Under the title, names of authors should be typed upper and lowercase (e.g., T. E. Smith) and in boldface. Institutional addresses are displayed below the author names; footnotes referring from author names to displayed addresses should be symbols in the following order: *, †, ‡, #, §, ||, and ¶. The full name, mailing address, phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author should appear directly below the affiliation lines on the title page. The corresponding author will be identified by a numbered footnote and e-mail address below the accepted line on the first page of the published article (e.g.,¹Corresponding author: my.name@university.edu). Note that no period follows the corresponding author's e-

mail address. Supplementary address information may be given in footnotes to the first page; use numerals for these footnotes. Acronyms (except USDA) for affiliations are discouraged unless the acronym is the official name. State or provincial postal code abbreviation is not included between city and zip code if the state or province is previously mentioned in the address (see example). Acceptable format is shown below:

J. E. Smith,* R. A. Jones,† and A. T. Peters‡

*Department of Animal Science, and †Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison 53706 ‡Department of Animal Science, Utah State University, Logan 84321

Abstract. Abstracts should be limited to 2,500 keystrokes (i.e., characters plus spaces). The abstract should review important objectives, materials, results, conclusions, and applications as concisely as possible. The abstract disseminates scientific information through abstracting journals and is a convenience for readers. Open the abstract with objectives and make the abstract intelligible without reference to the manuscript. Use complete sentences and standard terms. Limit the use of abbreviations in the Abstract. Refer to the list on the inside front cover of JDS or Appendices 1 and 2 of this document for those terms that should be defined in the abstract. If a term is used less than 3 times in the abstract, it should be spelled out at each use.

Minimize the amount of data in the abstract and exclude statements of statistical probability (e.g., $P < 0.05$). Exclude references to other work because the abstracts will appear online and in indexing services without the reference list.

Key Words. After the abstract, list 2 to 5 key words or phrases; they should be typed in lowercase letters and separated by commas. Key words should be singular (e.g., "dairy cow" not "dairy cows").

Abbreviations

Author-derived abbreviations should be defined at first use in the abstract, and again in the body of the manuscript, and in each table and figure in which they are used. Author-derived abbreviations will be shown in bold type at first use in the body of the manuscript. Refer to the Miscellaneous Usage Notes for more information on abbreviations.

Body of the Paper

The body of the paper should contain an introduction to the problem (questions, objectives, reasons for research, and related literature); materials, methods, experimental design, and procedures; and results, discussion, conclusions, and applications.

Results and discussion may be combined into a single section. If not, the results section should not contain discussion of previously published work. Results and references to tables and figures already described in the results section should not be repeated in the discussion section. The conclusions section (optional) should consist of one brief paragraph summarizing the main findings of the study.

Appendix

A technical appendix, if desired, shall follow the References section. The appendix may contain supplementary material, explanations, and elaborations that are not essential to other major sections but are helpful to the reader. Novel computer programs or mathematical computations would be appropriate. The appendix will not be a repository for raw data.

References

List only pertinent references. No more than 3 references should be needed to support a specific concept. Research papers and reviews should cite a reasonable number of references. Abstracts and articles from nonpeer-reviewed magazines and proceedings should be cited sparingly. Citation of abstracts published more than 3 yr ago is strongly discouraged.

Citations in Text. In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that the authors' names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993) with citations listed chronologically and then alphabetically within a year. Where there are more than 2 authors of one article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as: "J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication)." The author's own unpublished work should be listed in the text as "(J. Smith, unpublished data)." Personal communications and unpublished data (including papers under review) must not be included in the references section.

References Section. To be listed in the references section, papers must be published or accepted for publication. Manuscripts submitted for publication can be cited as "unpublished data" in the text. In the references section, references shall first be listed alphabetically by author(s)' last name(s), and then chronologically. The year of publication follows the authors' names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors' names must appear in the reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). A short list of journal title abbreviations is provided in Appendix 3 of this document. Oneword titles are spelled out. Inclusive page numbers must be provided and digital object identifiers (doi) should be provided whenever possible. Sample references are given below.

Journals

Buch, L. H., A. C. Sorensen, J. Lassen, P. Berg, J.-A. Eriksson, J. H. Jakobsen, and M. K. Sorensen. 2011. Hygiene-related and feed-related hoof diseases show different patterns of genetic correlations to clinical mastitis and female fertility. *J. Dairy Sci.* 94:1540-1551. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3137>.

Chapinal, N., A. M. de Passille, D. M. Weary, M. A. Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. C. Chamberlain, K. Savin, C. P. van Tassell, T. S. Sonstegard, and M. E. Goddard. 2009.

A validated genomewide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS ONE* 4:e6676.

de Vries, M. J., and R. F. Veerkamp. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J. Dairy Sci.* 83:62-69.

Jenkins, T. C., E. Block, and P. H. Morris. 2011. Potassium reduces the accumulation of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and trans-18:1 in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms regardless of dietary fat level. *J. Dairy Sci.* 94(E-Suppl. 1):509. (Abstr.)

VanRaden, P. M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91:4414-4423.

Books

AOAC International. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*. Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

Lengemann, F. W., R. A. Wentworth, and C. L. Comar. 1974. Physiological and biochemical aspects of the accumulation of contaminant radionuclides in milk. Pages 159-170 in *Lactation: A Comprehensive Treatise. Nutrition and Biochemistry of Milk/Maintenance*. Vol. 3. B. L. Larson and V. R. Smith, ed. Academic Press, London, UK.

National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Conferences

Barbano, D. M. 1996. Mozzarella cheese yield: Factors to consider. Page 29 in *Proc. Wisconsin Cheese Makers Mtg. Ctr. Dairy Res., Univ. Wisconsin, Madison*.

National Mastitis Council. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfections published since 1980. Pages 82-92 in *Natl. Mastitis Counc. Reg. Mtg. Proc., Harrisburg, PA. Natl. Mastitis Counc., Inc., Madison, WI*.

Other

Biernoth, G., and W. Merk, inventors. 1985. Fractionation of milk fat using a liquified gas or a gas in the supercritical state. Unilever NV-PLC, assignee. US Pat. No. 4,504,503.

FASS. 2010. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. 3rd ed. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL.

Interbull. 2008. Genetic evaluation. Direct longevity. Accessed Dec. 20, 2012. <http://www.interbull.slu.se/longevity/l-aug08.html>.

Kelly, M. G. 1977. Genetic parameters of growth in purebred and crossbred dairy cattle. MS Thesis. North Carolina State Univ., Raleigh.

Department of Agriculture, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collection at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. Fed. Regist. 69:10137-10151.

Table 1. Effect of garlic oil, diallyl disulfide, allyl mercaptan, monensin, and lovastatin on a 17-h in vitro batch culture rumen microbial fermentation trial

Item	Treatment ¹						SEM ²
	Control	GAR300	DAD300	ALM300	MON	LOV	
pH	6.6	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	0.01
Apparent disappearance of DM, %	61.0 ^a	50.7 ^b	51.2 ^b	60.4 ^a	53.9 ^b	62.4 ^a	1.11
Fiber digestibility							
NDF, %	56.8 ^a	44.3 ^b	41.4 ^b	55.9 ^a	39.3 ^b	60.0 ^a	1.73
ADF, %	53.7 ^a	36.8 ^b	34.9 ^b	52.5 ^a	30.7 ^b	57.0 ^a	2.03
Gas, μ mol	4,674.8 ^a	3,756.9 ^{cd}	3,359.7 ^d	4,388.2 ^{ab}	4,009.6 ^{bc}	4,673.1 ^a	123.34
CH ₄ , μ mol	417.3 ^a	110.1 ^d	131.3 ^d	335.9 ^b	241.7 ^c	396.3 ^a	21.56
Total VFA, mM	49.3 ^a	39.7 ^c	38.8 ^c	45.4 ^b	45.7 ^{ab}	48.4 ^{ab}	1.17
Individual, mol/100 mol							
Acetate	61.2 ^a	54.3 ^d	53.9 ^d	58.3 ^b	56.4 ^c	61.1 ^a	0.53
Propionate	22.6 ^d	25.8 ^c	28.3 ^b	22.8 ^d	34.2 ^a	22.8 ^d	0.78
Butyrate	12.5 ^c	16.5 ^a	14.0 ^{bc}	15.0 ^{ab}	6.6 ^d	12.4 ^c	0.60
Branched-chain VFA	2.0 ^a	1.7 ^b	1.7 ^b	2.0 ^a	1.4 ^c	2.0 ^a	0.10
C2:C3	2.7 ^a	2.1 ^b	1.9 ^c	2.5 ^a	1.6 ^d	2.7 ^a	0.07
CH ₄ (μ mol):VFA (μ mol)	0.20 ^a	0.05 ^d	0.07 ^{cd}	0.15 ^{ab}	0.10 ^{bcd}	0.17 ^{ab}	0.00
N-NH ₃ , mg/100 mL	16.7 ^{ab}	16.6 ^{bc}	19.0 ^a	17.2 ^{ab}	14.4 ^c	16.4 ^{bc}	1.10

^{a-d}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Treatments: GAR300 = 300 mg/L *Allium sativa* (garlic oil); DAD300 = 300 mg/L diallyl disulfide; ALM300 = 300 mg/L allyl mercaptan; MON = 12.5 mg/L monensin; LOV = 5 mg/L lovastatin.

²SEM = standard error of the mean.

Tables

The use of tables should be minimized. When used, tables should be self-explanatory and may be the most effective way to organize extensive data. Refer to Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers for more information on effective use of tables. Table 1 in this document may be used as an example.

Tables must be prepared using the table feature in Microsoft Word; tables prepared in other programs (e.g., Excel) or by using spaces, tabs, and hard returns will not convert accurately and errors can result. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns will create layout problems).

Place table number and title on the same line above the table (as shown in sample table). The table title does not require an ending period.

Do not use vertical lines and use few horizontal lines. Bold and italic typefaces should not be used in tables. When it is necessary to do so, such use must be defined in a footnote. Limit the data field to the minimum needed for meaningful comparison within the accuracy of the methods.

For each table, spell out the first use of abbreviations in parentheses or in numbered footnotes. Abbreviations should conform to journal style and be consistent with those used in the text. Avoid reference to other tables, figures, or text.

Footnotes to tables should be numerals. Each footnote should begin a new line (see sample table). For differences among means within a row or column, superscript letters should be used as appropriate sequentially (e.g., a, ab, b, c, cd) consistently from largest to smallest means. Probability may be indicated thus: † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figures

To facilitate review, figures should be placed at the end of the manuscript (separated by section breaks). Each figure should be placed on a separate page, and identified by the last name of the first author and figure number. Figure captions should be typed (double spaced) on a separate page.

- **Figure size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be prepared to fit one column (8.9 cm wide), 2 columns (14 cm wide), or full-page width (19 cm wide).
- **Font size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.
- **Fonts.** Use Helvetica, Times New Roman, Arial, and the symbols palette within those fonts only.
- **Line weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines. Avoid the use of gray or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.
- **Axis labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses.
- **Shading and fill patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed; e.g., black, white, gray, diagonal stripes. Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print. Remove unnecessary backgrounds and gridlines from graphs.
- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only:

Table 1. Effect of garlic oil, diallyl disulfide, allyl mercaptan, monensin, and lovastatin on a 17-h in vitro batch culture rumen microbial fermentation trial

Item	Treatment ¹						SEM ²
	Control	GAR300	DAD300	ALM300	MON	LOV	
pH	6.6	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	0.01
Apparent disappearance of DM, %	61.0 ^a	50.7 ^b	51.2 ^b	60.4 ^a	53.9 ^b	62.4 ^a	1.11
Fiber digestibility							
NDF, %	56.8 ^a	44.3 ^b	41.4 ^b	55.9 ^a	39.3 ^b	60.0 ^a	1.73
ADF, %	53.7 ^a	36.8 ^b	34.9 ^b	52.5 ^a	30.7 ^b	57.0 ^a	2.03
Gas, μ mol	4,674.8 ^a	3,756.9 ^{cd}	3,359.7 ^d	4,388.2 ^{ab}	4,009.6 ^{bc}	4,673.1 ^a	123.34
CH ₄ , μ mol	417.3 ^a	110.1 ^d	131.3 ^d	335.9 ^b	241.7 ^c	396.3 ^a	21.56
Total VFA, mM	49.3 ^a	39.7 ^c	38.8 ^c	45.4 ^b	45.7 ^{ab}	48.4 ^{ab}	1.17
Individual, mol/100 mol							
Acetate	61.2 ^a	54.3 ^d	53.9 ^d	58.3 ^b	56.4 ^c	61.1 ^a	0.53
Propionate	22.6 ^d	25.8 ^c	28.3 ^b	22.8 ^d	34.2 ^a	22.8 ^d	0.78
Butyrate	12.5 ^c	16.5 ^a	14.0 ^{bc}	15.0 ^{ab}	6.6 ^d	12.4 ^c	0.60
Branched-chain VFA	2.0 ^a	1.7 ^b	1.7 ^b	2.0 ^a	1.4 ^c	2.0 ^a	0.10
C2:C3	2.7 ^a	2.1 ^b	1.9 ^c	2.5 ^a	1.6 ^d	2.7 ^a	0.07
CH ₄ (μ mol):VFA (μ mol)	0.20 ^a	0.05 ^d	0.07 ^{cd}	0.15 ^{ab}	0.10 ^{bcd}	0.17 ^{ab}	0.00
N-NH ₃ , mg/100 mL	16.7 ^{ab}	16.6 ^{bc}	19.0 ^a	17.2 ^{ab}	14.4 ^c	16.4 ^{bc}	1.10

^{a-d}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Treatments: GAR300 = 300 mg/L *Allium sativa* (garlic oil); DAD300 = 300 mg/L diallyl disulfide; ALM300 = 300 mg/L allyl mercaptan; MON = 12.5 mg/L monensin; LOV = 5 mg/L lovastatin.

²SEM = standard error of the mean.

Symbols should be defined in the figure caption or in a key on the figure (but not both).

- **File formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG formats.
- **Grayscale figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.
- **Color figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).
- **Resolution.** Minimum resolution is 300 dpi for grayscale and color figures, and 600 dpi for line art.
- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100x) inappropriate.

- **Captions.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood without excessive reference to the text. All author-derived abbreviations and symbols used in the figure should be defined in the caption.
- **General tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.
- **Color Charge.** The cost to publish each color figure is \$650; a surcharge for offprints will also be assessed. At the time of submission on Manuscript Central, authors will be asked to approve color charges for figures that they wish to have published in color in the print journal. Color versions of figures can be included in the online PDF and full-text article at no charge.

Online-Only Data Supplements.

Authors are now able to present material online that cannot physically be displayed in the print journal (e.g., Excel files, video), or that might be cost-prohibitive (e.g., extra tables or large data sets), or that is too detailed for publication in the print issue. A note will appear in the print version that more material can be found online. A small charge may be levied for preparing data supplements; contact journal headquarters (journals@assochq.org) for more information. Material posted online only must go through the review process, and consequently should be in an application or format easily accessible by most reviewers and readers.

Audio Slides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief (less than 5 minutes), webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. You will receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after your paper has been posted to the Articles in Press site.

Statistical Analysis

Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. For group-fed animals, the group of animals in the pen or the paddock is the

experimental unit; therefore, groups must be replicated. Repeated chemical analyses of the same sample usually do not constitute independent experimental units. Measurements on the same experimental unit over time also are not independent and must not be considered as independent experimental units. For analysis of time effects, use time-sequence analysis.

Usual assumptions are that errors in the statistical models are normally and independently distributed with constant variance. Most standard methods are robust to deviations from these assumptions, but occasionally data transformations or other techniques are helpful. Most statistical procedures are based on the assumption that experimental units have been assigned to treatments at random. If animals are stratified by ancestry or weight or if some other initial measurement should be accounted for, the model should include a blocking factor, or the initial measurement should be included as a covariate.

A parameter [mean (μ), variance (σ^2)], which defines or describes a population, is estimated by a statistic ($\bar{x}$, s^2). The term parameter is not appropriate to describe a variable, observation, trait, characteristic, or measurement taken in an experiment.

Standard designs are adequately described by name and size (e.g., "a randomized complete block design with 6 treatments in 5 blocks"). For a factorial set of treatments, an adequate description might be as follows: "Tryptophan at 0.05 or 0.10% of the diet and niacin at 5, 10, or 20 mg/kg of diet were used in a 2 x 3 factorial arrangement in 5 randomized complete blocks, each block consisting of littermates." Note that a factorial arrangement is not a design; the term "design" refers to the method of grouping experimental units into homogeneous groups or blocks (i.e., the way in which the randomization is restricted).

Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that differences are not "statistically significant" is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by " $\pm$ " to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only (1) the number of observations, (2) arithmetic treatment means, and (3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

For more complex experiments, tables of subclass means and tables of analyses of variance or covariance may be included. When the analysis of variance contains several error terms, such as in split-plot and repeated measures designs, the text

should indicate clearly which mean square was used for the denominator of each Fstatistic. Unbalanced factorial data can present special problems. Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases.

Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni t statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged. Fixed-range, pairwise, multiple comparison tests should be used only to compare means of treatments that are unstructured or not related. In factorial treatment arrangements, means for main effects should be presented when important interactions are not present. Means for individual treatment combinations also should be provided in table or text so that future researchers may combine data from several experiments to detect important interactions. An interaction may not be detected in a given experiment because of a limitation in the number of observations.

The terms significant and highly significant traditionally have been reserved for $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; however, reporting the P-value is preferred to the use of these terms. For example, use "... there was a difference ($P < 0.05$) between control and treated samples" rather than "... there was a significant ($P < 0.05$) difference between control and treated samples." When available, the observed significance level (e.g., $P = 0.027$) should be presented rather than merely $P < 0.05$ or $P < 0.01$, thereby allowing the reader to decide what to reject. Other probability (alpha) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report P-values to more than 3 places after the decimal. Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis should be based on the relative consequences of Type I and II errors. A "nonsignificant" relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship. An inadequate number of experimental units or insufficient control of variation limits the power to detect relationships. Avoid the ambiguous use of $P > 0.05$ to declare nonsignificance, such as indicating that a difference is not significant at $P > 0.05$ and subsequently declaring another difference significant (or a tendency) at $P < 0.09$. In addition, readers may incorrectly interpret the use of $P > 0.05$ as the probability of a beta error, not an alpha error.

Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. In most cases, 2 or 3 significant digits (not decimal places) are sufficient.

Sensory Data

Sensory data should comply with the "Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods," Journal of Dairy Science 90:4925-4937. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0332>.

Nomenclature

Genes and Proteins. The journal recommends using internationally accepted symbols for genes and proteins; such symbols may be used without definition. Symbols for specific genes and proteins can be obtained by querying the gene database of PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Nomenclature rules for humans, nonhuman primates, and livestock are available at <http://www.genenames.org>, and rules for mice and rats are at <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>. Gene symbols should be shown in italics (e.g., *SERPINA14*) and proteins in roman text (e.g., SERPINA14). Gene symbols are generally shown in all uppercase letters (e.g., LHB), except in mice and rats, where only the first letter is capitalized (e.g., Lhb)

Single Nucleotide Polymorphisms. The increasing number of SNP association studies and the improvements in bovine genome annotation require a standardized SNP nomenclature for unequivocal and correct SNP identification. Additionally, information regarding the SNP investigated should be easily accessible in a publicly available database. Therefore, all relevant SNP included in a study should be listed with their unique RefSNP (rs) or submitted SNP (ss) number (if rs number is not yet available) as indicated in the public domain NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). If the SNP investigated do not yet have an entry in the NCBI dbSNP database, the authors of the manuscript are responsible for submitting all the required information to NCBI (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) for depositing the SNP into the database and obtaining a unique ss number for the SNP. In the text of the manuscript, use the rs/ss number of the SNP or an alternative standardized nomenclature.

Microorganisms. All microorganisms must be named by genus and species. The name of the genus must appear in full the first time that the microorganism is cited in the abstract, in the body of the paper, and in each table and figure legend. Thereafter, the genus can be abbreviated by its first initial unless it will be confused with other microorganisms cited in the paper, in which case each genus should be abbreviated to use enough letters to avoid confusion (e.g., *Strep.* vs. *Staph.*). The formal, binomial names of all microorganisms should be in italics. Specific strain designations and numbers should be used when appropriate. Authorities are not required.

For microorganisms that are genetic variants of a parent strain, the genotypic and phenotypic properties should be cited according to the procedures described by Demerec et al. (1966) in *Genetics* 54:61-76. Phenotypes should be identified by 3 letters; the first is capitalized. Genotypes should be identified by 3 lowercase italic letters. Superscript plus (+) signs are used to refer to a wild-type. The serial isolation number is placed after the locus symbol for mutations. The delta symbol is used to indicate deletions. Nomenclature for bacterial plasmids should be cited according to Novick et al. (1976) in *Bacteriological Reviews* 40:168-189.

Enzymes. Mention of an enzyme should include the EC number.

In Vitro Antimicrobial Susceptibility Tests

Please refer to the JDS policy in Appendix 4 of this document.

Miscellaneous Usage Notes

Abbreviations. Abbreviations should not be used in the title, key words, or to begin sentences, except when they are widely known throughout science (e.g., DNA, RNA) or are terms better known by their abbreviation (e.g., IgG, CD). Abbreviations may be used in heads within the paper if they have been first defined within the text. The inside front cover of every issue of the journal lists abbreviations that can be used without definition. The list is subject to revision at any time, so authors should always consult the most recent issue of the journal (or the updated list at <http://www.journalofdairyscience.org>) for relevant information. Abbreviations are allowed when they help the flow of the manuscript; however, excessive use of abbreviations can confuse the reader. The suitability of abbreviations will be evaluated by the reviewers and editors during the review process and by the technical editor during editing. As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used fewer than 3 times after first use must be spelled out in full rather than abbreviated. Do not use capitalized whole words (e.g., CORN) as treatment abbreviations, or single-letter abbreviations that could be confused with chemical elements (e.g., P, C, S). All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter.

The abstract, text, each table, and each figure must be understood independently of each other. Therefore, abbreviations shall be defined within each of these units of the manuscript.

Plural abbreviations do not require "s." Chemical symbols and 1-letter and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Bacterial genus names are abbreviated according to the guidelines recommended in *Scientific Style and Format* (8th ed.), and the abbreviated form should not be shown in bold at first use. Units of measure, except those in the standard JDS abbreviation list, should be abbreviated according to standard SI usage and do not need to be defined. See Appendix 2 for a list of commonly used terms.

International Words and Phrases. Non-English words in common usage (i.e., recent editions of standard dictionaries) will not appear in italics (e.g., *in vitro*, *in vivo*, *ad libitum*, *in situ*, *a priori*). However, genus and species of plants, animals, or bacteria and viruses should be italicized. Authors must indicate accent marks and other diacriticals on international names and institutions. German nouns shall begin with capital letters.

Capitalization. Breed and variety names are to be capitalized (e.g., Holstein, Danish Red). Trademarked or registered names should be capitalized, but no TM or ® symbols should be used. Proper nouns should be capitalized.

Numbers and Units. The Journal of Dairy Science uses the Council of Science Editors' number style given in the seventh edition of *Scientific Style and Format*.

Numbers less than 1 shall be written with preceding zeros (e.g., 0.75). All numbers shall be written as digits; a comma separator must be used in numbers greater than 999 (e.g., 2,478). Measures must be in the metric (SI) system; however, US equivalents may be given in parentheses. Units of measure not associated with a numeric value must be written out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in

milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically. Measures of variation must be defined in the Abstract and in the body of the paper at first use.

General Usage. Note that "and/or" is not permitted; choose the more appropriate meaning or use "x or y or both."

Use the slant line only when it means "per" with numbered units of measure or "divided by" in equations. Use only one slant line in a given expression: e.g., g/cow per day. The slant line may not be used to indicate ratios or mixtures.

Use "to" instead of a hyphen to indicate a range of values in text; an en-dash may be used to indicate a range in parenthetical text or tables.

Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation (=, -, +, x, >, or <) when these signs occur between 2 items.

Items in a series should be separated by commas: e.g., a, b, and c.

Restrict the use of "while" and "since" to meanings related to time. Appropriate substitutes include "and," "but," or "whereas" for "while" and "because" or "although" for "since."

Commercial Products. The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is being tested as part of the experiment, the manufacturer and location should be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures, but, when possible, the generic name should be used thereafter. Only generic names should be used in article titles. Trademark symbols and registration marks should not be used and will be removed.

Avoid describing a method as "per manufacturer's instructions." If the product goes out of production, the method will be lost to readers. Many products come with literature references; try to use references that can be found by other researchers to describe a method being used.

Supplemental Information

The following information is available online and updated regularly. Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles and words used in citations is available in Appendix 3.

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>

Figure and Table Preparation Guidelines. Current information on figure and table preparation can be found at <http://www.journalofdairyscience.org/>

Manuscript Central Instructions. Manuscripts are submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>. Full user instructions for using the Manuscript Central system are available at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds/index.html?mode=instruction>.