

Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho

Detection of toxigenic genes in samples of Staphylococcus spp. isolated from rennet cheese

Manuela Figueiroa Lyra de FREITAS¹, Isabelle da Silva LUZ², José Wilton PINHEIRO JÚNIOR³, Dalila Angélica Moliterno DUARTE⁴, Ana Mercia Mendes VASCONCELOS⁴, Aldemir Reginato RIBEIRO⁴, Rinaldo Aparecido MOTA^{5*}, Tereza Cristina Leal BALBINO⁶, Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD⁷

Resumo

Objetivou-se com este trabalho isolar, quantificar e investigar em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho, a presença dos genes toxigênicos *sea-see*, *seg-sej*, *tst*, *eta* e *etb* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram verificadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) variando de 10² a 10⁶ UFC.g⁻¹. Os genes toxigênicos *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foram identificados em 18 dos 20 isolados de *Staphylococcus* spp. com os seguintes percentuais 5, 11, 9, 20, 16, 25 e 14% respectivamente. A presença de elevado percentual de isolados contendo diferentes genes toxigênicos é preocupante para a saúde do consumidor pela possibilidade de produzirem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares. A ocorrência de vários genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa é outro fato importante, pois no Brasil não existe legislação com determinação de limites para *Staphylococcus* coagulase negativa em alimentos.

Palavras-chave: queijo coalho; PCR; enterotoxina.

Abstract

The aim of this study was to isolate, quantify, and investigate samples of *Staphylococcus* spp. from rennet or coalho cheese (a firm but very lightweight cheese produced in Brazil) and determine the presence of the toxigenic genes *sea-see*, *seg-sej*, *tst*, *eta*, and *etb* by the polymerase chain reaction (PCR). Counts of coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS) were found varying from 10² to 10⁶ CFU.g⁻¹. The toxigenic genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* were identified in 18 of the 20 isolates of *Staphylococcus* spp. at the following percentages: 5, 11, 9, 20, 16, 25, and 14%, respectively. The presence of a high percentage of isolates containing different toxigenic genes is a matter of concern for the health of the consumer due to the possible production of toxins responsible for food poisoning. The presence of various toxigenic genes in samples of coagulase-negative *Staphylococcus* is another important fact because there are no laws in Brazil regarding limitations on the presence of coagulase-negative *Staphylococcus* in foods.

Key words: rennet cheese; PCR; enterotoxin.

1 Introdução

O queijo de coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos no Nordeste brasileiro e devido a sua produção artesanal, é amplamente fabricado nesta região. É também um importante derivado do leite, apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características organolépticas, bem como, torná-lo impróprio para consumo, em virtude da contaminação por microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares (SÁ et al., 2003).

Elevados índices de *Staphylococcus aureus* ocorrem em queijos, tanto no Brasil (HOFFMANN; SILVA; VINTURIM, 2002) como em outros países do mundo (NORMANNO et al., 2005), incluindo cepas de estafilococos enterotoxigênicos. Por isso, o queijo ocupa lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, veiculando principalmente *Staphylococcus* spp. (VERAS et al., 2003).

Sendo o queijo de coalho um alimento muito consumido no Estado de Pernambuco, objetivou-se com este trabalho realizar

Recebido para publicação em 3/10/2007

Aceito para publicação em 22/1/2008 (002903)

¹ Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão – PE, CEP 55608-680; E-mail: manuelaflff@uol.com.br

² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP 50670-420, CP 7472

³ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRP, Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP 55296-901, Garanhuns – PE, E-mail: jrwilton@uag.ufrpe.br

⁴ Setor de Microbiologia, LANAGRO – PE

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRP, Rua Dom Manuel, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife – PE, E-mail: canjani_ch@hotmail.com

⁶ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP 50670-420, CP 7472

⁷ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP 50670-901

*A quem a correspondência deve ser enviada

o isolamento e quantificação de *Staphylococcus* spp. e investigar a presença de genes toxigênicos utilizando a técnica de PCR.

2 Material e métodos

Foram analisados 20 isolados de *Staphylococcus* spp. de dez amostras de queijos de coalho comercializadas no Estado de Pernambuco, seguindo o método preconizado pela Coordenação de Laboratório Animal (CLA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. O cálculo para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/g) foi realizado em função do número de colônias típicas e atípicas contadas, diluição inoculada e percentual de colônias confirmadas (BRASIL, 2003).

Para a identificação dos estafilococos foram verificadas características morfológicas das colônias em ágar base acrescido de 8% de sangue desfibrinado de carneiro e coloração pela técnica de Gram, produção de hemólise e provas bioquímicas como catalase, coagulase, termonuclease, fermentação da glicose em anaerobiose, fermentação do manitol em aerobiose e anaerobiose e produção de acetoina. Após a realização dos testes, os isolados foram identificados como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN).

O DNA genômico dos *Staphylococcus* spp. foi extraído de acordo com Fritsch, Maniatis e Sambrook (1989) e quantificado

no programa 1D Image Analysis, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera, após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando-se o DNA do fago λ clivado com a enzima *HindIII*.

Para a pesquisa dos genes toxigênicos foram realizadas duas reações de PCR-Multiplex, uma para pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* e outra para pesquisa dos genes *eta*, *etb* e *tst*, bem como, quatro reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*. Os *primers* para as reações de PCR foram sintetizados tendo como base as sequências publicadas por Becker, Roth e Peters (1998), Rosec e Gigaud (2002) e Omoe et al. (2002) (Tabela 1).

As reações de PCR-Multiplex foram preparadas para um volume final de 25 μ L contendo 20 pmol de cada *primer*, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl, 160 μ M de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 20 ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95 °C por 1 minuto (desnaturação), 55 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 2 minutos (extensão). Foram usados como controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI MN 8 (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) portadora do gene *tst* e FRI 361 portadora dos genes *sec* e *sed*.

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, separadamente, consistiu de uma mistura de 20pmol de

Tabela 1. *Primers* usados para a detecção por PCR dos genes *sea-see*, *seg-sej*, *tst*, *eta* e *etb* em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, Brasil.

| Gene | Primer | Sequência de Oligonucleotídeos (5' → 3') | Tamanho do Fragmento (pb) |
|--------|--------|--|---------------------------|
| *sea | SEA-3b | CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG | 127 |
| | SEA-4b | TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C | |
| *seb | SEB-1c | TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG | 477 |
| | SEB-4b | GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC | |
| *sec | SEC-3b | CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG | 271 |
| | SEC-4b | TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC | |
| *sed | SED-3b | CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG | 319 |
| | SED-4b | TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC | |
| *see | SEE-3b | CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC | 178 |
| | SEE-2c | TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC | |
| *tst | TST-3 | AAGCCCTTGTGTGCTTGCG | 445 |
| | TST-6 | ATCGAACTTTGGCCATACTTT | |
| *eta | ETA-3b | CTAGTGCATTTGTTATTCAGACG | 119 |
| | ETA-4b | TGCATTGACACCATAGTACTTATTC | |
| *etb | ETB-3b | ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G | 262 |
| | ETB-4b | AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC | |
| **seg | SEG-1 | ACGTCTCCACCTGTTGAAGG | 400 |
| | SEG-2 | TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG | |
| **seh | SEH-1 | TCACATCATATGCGAAAGCAG | 357 |
| | SHE-2 | TAGCACCAATCACCTTTCC | |
| ***sei | SEI-1 | GGTGATATTGGTGTAGGTAAC | 454 |
| | SEI-2 | ATCCATATTCTTTGCCCTTACCAG | |
| **sej | SEJ-1 | CAGCGATAGCAAAAATGAAACA | 426 |
| | SEJ-2 | TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA | |

*BECKER, ROTH e PETERS (1998); **ROSEC e GIGAUD (2002); e ***OMOE et al. (2002).

cada *primer*, 160 μ M de cada dNTP, 1,5 mM do $MgCl_2$, 10 mM do Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl, 20 ng do DNA genômico e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em um volume final de 25 μ L. As amplificações para os genes *seg*, *seh* e *sej* foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94 °C por 3 minutos, 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. A amplificação do fragmento para o gene *sei* foi programada para 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos. Foi usada para controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*.

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídeo (10mg/mL) por 15 minutos, visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Para confirmar se os segmentos amplificados pela PCR faziam parte dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* o padrão de restrição dos fragmentos foi obtido. A enzima *RsaI* foi selecionada para a digestão dos fragmentos amplificados pela PCR dos genes *seg* e *sej* e a enzima *DraI* para o gene *seh*, de acordo com Rosec e Gigaud (2002). Avaliando-se os sítios de restrição através do programa *Generunner DNA Sequence Analyses software*, versão 3.05 disponível gratuitamente na rede, a enzima *RsaI* foi utilizada para a digestão dos fragmentos amplificados pela PCR dos genes *sec*, *sed* e *sei* e a *DraI* para o gene *tst*. O tamanho dos fragmentos obtidos após restrição foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,8%.

Para confirmar que o segmento amplificado era parte dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* os segmentos foram purificados com o kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Brasil) e analisados através do sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). As sequências dos nucleotídeos obtidas foram analisadas pelo programa Agrupamento das sequências de *S. aureus* – *forward* e *reverse* (HUANG; MADAN, 1999) e comparadas com sequências depositadas no GenBank versão 2.2.12 do programa Blast (ALTSCHUL et al., 1990).

3 Resultados e discussão

Das 20 amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas, 11 (55%) foram identificadas como *S. aureus*, seis (30%) como SCP e três (15%) como SCN. As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva nas dez amostras de queijos de coalho variaram de 10^2 a 10^6 UFC/g. Resultados semelhantes foram encontrados por SENA (2000) que verificou contagens variando de 10^3 a 10^7 UFC/g em queijos de coalho em Recife e por BARBOSA et al. (2004) que encontraram contagens de 10^3 a 10^6 UFC/g em queijos de coalho comercializados em Teresina.

De acordo com a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), o limite padrão para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de coalho é de 5×10^3 UFC/g. Das dez amostras analisadas, nove (90%) estavam com valores superiores ao padrão estabelecido. Estes achados corroboram com os de Sá et al. (2003) que também relataram elevados índices de amostras de queijos fora do padrão.

O *S. aureus* é um patógeno responsável por intoxicações que resultam da ingestão de alimentos contaminados por

enterotoxinas termoestáveis e pré-formadas (SU; WONG, 1997) e representa um risco sanitário quando níveis desta bactéria atingem contagens em torno de 10^5 a 10^6 UFC/g ou mL no alimento (JABLONSKI; BOHACH 1997). Neste estudo, 60% das amostras de queijo de coalho apresentaram contagens em torno de 10^5 a 10^6 UFC/g.

No que se refere à pesquisa de genes toxigênicos, constatou-se que 10% das amostras não apresentaram nenhum dos genes toxigênicos *sea-see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tst*, *eta* e *etb* e 90% foram positivas para um ou mais genes toxigênicos. A frequência dos genes toxigênicos em *Staphylococcus* spp. foi: *seg* (20%); *seh* (16%); *sei* (25%); *sej* (14%); *sec* (11%); *sed* (9%); e *tst* (5%). No entanto, não se observou a presença de genes para as toxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEE, ETA e ETB em nenhuma das amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas.

Das amostras que apresentaram genes toxigênicos, 11% portavam apenas um gene, 11% dois genes, 45% três genes, 11% cinco genes e 22% seis genes, verificando-se os seguintes genótipos: *tst* 1/18 isoladamente; *sei* 1/18 isoladamente; 2/18 a associação (*seh* + *sei*) e 5/18 as associações (*seg* + *sei* + *sej*); 1/18 (*tst* + *seg* + *seh*); 1/18 (*sec* + *sed* + *sei*); 1/18 (*seg* + *seh* + *sei*); 1/18 (*sec* + *tst* + *seg* + *seh* + *sei*); 1/18 (*sec* + *sed* + *seg* + *seh* + *sei*); 4/18 (*sec* + *sed* + *seg* + *seh* + *sei* + *sej*).

Dos três isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa, um apresentou o genótipo (*seh* + *sei*) e dois o genótipo (*sec* + *sed* + *seg* + *seh* + *sei* + *sej*). Alguns estudos demonstram que SEC e SED estão associadas com contaminação animal, enquanto SEA e SEB à contaminação humana (BERGDOLL, 1990; RODRIGUES et al., 1993; SU et al., 1998). Jorgensen et al. (2005) constataram que 69% das cepas de *S. aureus* portavam os genes toxigênicos *tst*, *sea*, *sec*, *seg*, *seh* e *sei* e Loncarevic et al. (2005) demonstraram que 34% das cepas continham os genes *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, sendo estes resultados condizentes aos encontrados neste estudo, exceto pela ausência dos genes *sea* e *seb*, e a presença do gene *see* que não foi encontrado neste estudo.

A análise dos resultados utilizando o programa Blast revelou homologia superior a 90% entre os genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* entre os isolados estudados quando comparadas com sequências depositadas no GenBank. A comparação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* amplificados nas diferentes cepas e digeridos com as enzimas *RsaI* e *DraI*, revelou um padrão de restrição esperado e idêntico entre os isolados para cada gene estudado (Figura 1). Estes resultados são confirmatórios da presença dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa.

Ao avaliar a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* para as novas toxinas nos isolados de queijos de coalho, verificou-se que os genes mais frequentes foram o *seg* e *sei*. Estes achados são similares aos relatados por Loncarevic et al. (2005). Este fato é importante, pois tais cepas podem produzir as toxinas SEG e SEI e determinarem intoxicação alimentar, pois ao utilizar a técnica de PCR para estudar os genes *seg*, *seh* e *sei* em cepas de *S. aureus* de indivíduos envolvidos em casos de doenças de origem alimentar, Chen, Chiou e Tsen (2004) verificaram que em um dos pacientes a cepa de *S. aureus* isolada portava apenas

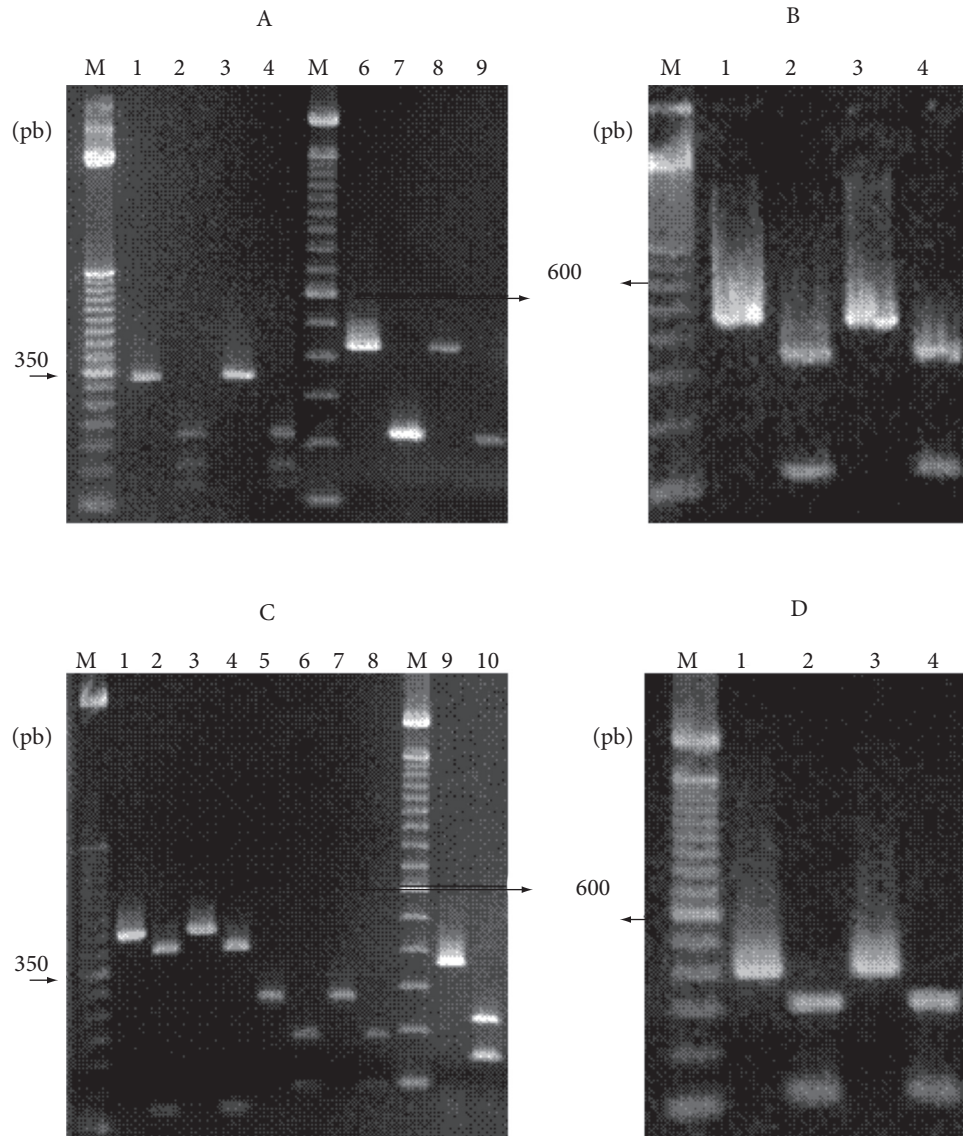


Figura 1. Produto de amplificação da PCR dos genes *sed*, *sej*, *sei*, *tst*, *sec*, *seh* e *seg* (A, linhas: 1 e 3, gene *sed*; A, linhas: 6 e 8, gene *sej*; B, linhas: 1 e 3, gene *sei*; C, linhas: 1 e 3, gene *tst*; C, linhas: 5 e 7, gene *sec*; C, linha: 9, gene *seh*; D, linhas: 1 e 3, gene *seg*) e seus padrões de restrição com as enzimas, *RsaI* (A, linhas: 2 e 4, gene *sed*; A, linhas: 7 e 9, gene *sej*; B, linhas: 2 e 4, gene *sei*; C, linhas: 6 e 8, gene *sec*; D, linhas: 2 e 4, gene *seg*) e *DraI* (C, linhas: 2 e 4, gene *tst*; C, linha: 10, gene *seh*).

o gene *seg*, enquanto em outro paciente, a cepa portava apenas o gene *sei*, sendo ambas as cepas negativas para a produção das toxinas clássicas SEA-SEE e não portadoras dos genes *sea-see*. Este fato demonstra que as toxinas mais recentes descobertas como SEG e SEI podem ser responsáveis por casos de intoxicação alimentar em menor frequência.

4 Conclusões

A presença de elevado percentual de isolados contendo diferentes genes toxigênicos é preocupante para a saúde do consumidor pela possibilidade de produzirem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares. A diversidade genética para os genes *se* em amostras de *Staphylococcus coagulase negativa* é

um fato importante, pois no Brasil não existe legislação com determinação de limites para *Staphylococcus coagulase negativa* em alimentos.

Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Agradecem também ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e ao Dr. Luiz Simeão do Carmo por ter cedido as cepas padrões FRI (Food Research Institute Madison, Wisconsin, EUA).

Referências bibliográficas

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BARBOSA, S. S. et al. Detecção de *Staphylococcus* sp em queijos de coalho adquiridos em Teresina, PI. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 13, 2004, Teresina. **Anais...** Teresina: UFPI, 2004. p. 27.
- BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, 1998.
- BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: RIEMMAN, H.; CLIVER, D. O. (Eds.). **Foodborne infections and intoxications**. New York: Academic Press, 1990. p. 85-106.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC, nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2 de Janeiro de 2001. Seção I, p. 45-53, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 de Setembro 2003. Seção I, p. 16-17; 36-37, 2003.
- 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**, v. 92, n. 2, p. 189-197, 2004.
- HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo "Minas Frescal", vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.
- HUANG, X.; MADDAN, A. Cap3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 68-877, 1999.
- JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington: American Society of Microbiology Press, 1997. p. 353-375.
- JORGENSEN, H. J. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 158-166, 2005.
- LONCAREVIC, S. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 344-350, 2005.
- FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 235 p.
- NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 73-79, 2005.
- OMOE, K. et al. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.
- RODRIGUES, L. A. et al. Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 6, p. 538-540, 1993.
- ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 61-70, 2002.
- SÁ, M. A. R. et al. Perfil microbiológico do queijo minas frescal comercializado no município de Uberlândia-MG. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104-105, p. 169-173, 2003.
- SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus sp.* isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE**. 2000. 75 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.
- SU, S. et al. Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1384-1386, 1998.
- VERAS, J. F. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104-105, p. 218, 2003.