



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

OCORRÊNCIA DE GENES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS
CLÁSSICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL

AMANDA CHAGAS DA SILVA

PATOS - PB

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

OCORRÊNCIA DE GENES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS
CLÁSSICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Campina
Grande, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária.

Autora: Amanda Chagas da Silva

Orientadora: Professora *Dra.* Maria das Graças Xavier de Carvalho

Coorientador: Professor *Dr.* Sérgio Santos de Azevedo

PATOS - PB

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR DA
UFCG**

S586p Silva, Amanda Chagas da
Ocorrência de Genes de Enterotoxinas Estafilocócicas Clássicas Em
Queijo de Coalho Artesanal / Amanda Chagas da Silva. – Patos,
2015.
73f. : il.
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural,
2015.
“Orientação: Prof^a. Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho”
“Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo”

Referências.

1. Queijo de coalho artesanal. 2. *Staphylococcus* spp. 3. PCR.
I. Título.

579.67

CDU

**OCORRÊNCIA DE GENES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS
CLÁSSICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL**

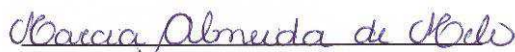
AMANDA CHAGAS DA SILVA

Aprovada em 28/08/2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB
(Orientadora)



Prof.ª Dra. Marcia Almeida de Melo
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB



Dra. Viviane Cambuí Figueiredo Rocha
Pós-Doutoranda do PPGMV/CSTR/UFCG – Patos/PB

PATOS

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família pelo apoio incondicional.

Ao meu querido companheiro, David, pelo amor e atenção, sempre.

A todos os professores da pós-graduação de Medicina Veterinária da UFCG.

À minha querida orientadora, Maria das Graças Xavier de Carvalho, pela sua imensa (imensa!) paciência para comigo.

Ao meu coorientador, Sérgio Santos de Azevedo, por todos os valiosos conselhos como pesquisador e professor.

À professora Márcia Melo por disponibilizar o Biomol para a execução das análises moleculares do projeto com tanto carinho e atenção.

Aos funcionários da UFCG que são muito queridos por mim: Elizabete (minha querida Bete), Dona Francinete, Jonas e Ednaldo.

Aos alunos da graduação e pós-graduação de Medicina Veterinária que ajudaram de forma direta ou indireta nas atividades deste projeto: Rodrigo, Layze, Danielle, Évyla, Lilyan, Olívia, Raizza, Laysa e Meire.

À Suely Cristina pela oportunidade de trabalhar com um produto tão importante como o queijo de coalho para a região do Sertão da Paraíba e pelos ensinamentos.

À Vivianne pelo auxílio nas análises moleculares e conselhos e ideias sobre o projeto.

À Rosália pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao professor Paulo Andrade pelas dicas e auxílio nas análises moleculares.

À minha querida amiga, Nara, por estar sempre disposta a ajudar e ser uma boa companhia pra conversar.

Aos meus queridos amigos Arthur, Leíse, Mariana, Júlia e Grasiene.

Ao professor Celso da UFPB pela doação das cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* essenciais para a execução do projeto.

À pesquisadora da EMBRAPA – Ceará, Maria de Fátima Borges, pelas informações essenciais para a execução de todo o projeto.

Aos produtores de queijo de coalho participantes do projeto.

E finalmente, ao CNPq, pela concessão da bolsa.

RESUMO

No Capítulo I, o objetivo do trabalho foi revisar a literatura nacional e internacional para descrever as características de *Staphylococcus* enterotoxigênicos (SE) no âmbito da produção das enterotoxinas em queijos. Também foi destacada a descrição dessas toxinas, as metodologias analíticas utilizadas para identificar e quantificar o agente etiológico e as toxinas envolvidas em intoxicações alimentares e surtos ocorridos no mundo provocados por estes microrganismos. Foi explorado também o complexo mecanismo de enterotoxigênese durante a produção dos queijos. No Capítulo II, foi avaliada a presença de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) e Coagulase Negativa (SCN) em queijo de coalho artesanal produzido na região do Sertão da Paraíba sendo coletadas 20 amostras durante o período chuvoso e seco. A contagem e identificação de SCP foram realizadas conforme o *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) da *Food and Drug Association* (FDA) e a pesquisa da presença dos genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e o gene *femA*, através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). No período chuvoso, as contagens de SCP variaram de $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/g enquanto no período seco, variaram de $1,0 \times 10^2$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/g; 40 colônias (29 SCP e 11 SCN) foram selecionadas sendo que três (7,5 %) apresentaram genes para as enterotoxinas. O gene *sec* foi encontrado em uma amostra SCP (período chuvoso) e os genes *sea* e *sed* encontrados em uma amostra SCP e também em uma amostra SCN (período seco). Nas amostras de queijo de coalho artesanal, 80 % (16/20) foram considerados impróprios para consumo, devido às altas contagens de SCP.

Palavras-chave: toxinas estafilocócicas, queijos, produção, queijo artesanal; *Staphylococcus* coagulase positiva; e negativa, PCR.

ABSTRACT

In the Chapter I, the objective of this study is to review the national and international literature to describe the characteristics of enterotoxigenic *Staphylococcus* (ES) within the production of enterotoxins in cheeses. Was also highlighted the description of these toxins, analytical methodologies used to identify the causal agent and quantify the toxins involved in food poisoning and reports outbreaks in the world caused by these microorganisms. Exploring the complex enterotoxigenesis mechanism for the production of cheeses was also highlighted. In Chapter II, was evaluated the presence of Coagulase Positive *Staphylococcus* (CPS) and Coagulase Negative (CNS) enterotoxigenic in artisanal coalho cheese produced in the Sertão region of Paraíba State; 20 samples were collected during the rainy and dry season. The CPS counting and identification were performed according to the Bacteriological Analytical Manual (BAM) from Food and Drug Administration (FDA) and for the presence of the classical enterotoxins genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) and the *femA* gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). In the rainy season, CPS counts ranged from $1,2 \times 10^4$ to $2,6 \times 10^5$ CFU/g and in the dry season ranged from 1×10^2 to $2,6 \times 10^5$ CFU/g; 40 (CPS 29 and 11 CNS) were selected and three (7.5 %) had enterotoxin genes. The *sec* gene was found in one CPS sample (rainy season) and *sea* and *sed* was found in one CPS sample and also in a CNS sample (dry season). In the artisanal coalho cheese samples, 80 % (16/20) were considered unfit for consumption, due to high counting of CPS.

Key-words: staphylococcal enterotoxins, cheese, manufacture, Artisanal cheese; Coagulase Positive *Staphylococcus*, PCR

1 **LISTA DE TABELAS**

2 **Capítulo I**

Tabela 1 – Fatores intrínsecos que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*..... 19

Tabela 2 - Características dos principais métodos de detecção de enterotoxinas..... 23

Tabela 3 – Fatores que afetam o crescimento do *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina estafilocócicas em queijos..... 24

3

4 **Capítulo II**

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a amplificação dos genes que codificam as enterotoxinas em *Staphylococcus*..... 42

Tabela 2 – Resultado das contagens de *Staphylococcus* Coagulase Positiva das amostras de queijo de coalho artesanal coletados durante o período chuvoso e seco no Sertão do Estado da Paraíba em 2014..... 43

5

6

7

8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – porcentagem

µm - micrômetro

agr – *Accessory Gene Regulator* – gene regulador acessório

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAL – Bactérias Ácido Láticas

BAM - *Bacteriological Analytical Manual*

BPF – Boas Práticas de Fabricação

Da – Dalton ou Unidade de Massa Atômica

DNA - *Desoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucléico

EE – Enterotoxina Estafilocócica

EEA - Enterotoxina Estafilocócica A

EEB - Enterotoxina Estafilocócica B

EEC1 – Enterotoxina Estafilocócica C1

EEC2 - Enterotoxina Estafilocócica C2

EEC3 - Enterotoxina Estafilocócica C3

EED - Enterotoxina Estafilocócica D

EEE - Enterotoxina Estafilocócica E

EEG - Enterotoxina Estafilocócica G

EEH - Enterotoxina Estafilocócica H

EEI - Enterotoxina Estafilocócica I

EEIJ - Enterotoxina Estafilocócica-like J

EEIK - Enterotoxina Estafilocócica-like K

EEIL - Enterotoxina Estafilocócica-like L

EEIM - Enterotoxina Estafilocócica-like M

EEIN - Enterotoxina Estafilocócica-like N

EEIO - Enterotoxina Estafilocócica-like O

EEIP - Enterotoxina Estafilocócica-like P

EEIQ - Enterotoxina Estafilocócica-like Q

EEIU - Enterotoxina Estafilocócica-like U

EEIU2 – Enterotoxina Estafilocócica-like U2

EER - Enterotoxina Estafilocócica R

EES - Enterotoxina Estafilocócica S

EET - Enterotoxina Estafilocócica T

EEV - Enterotoxina Estafilocócica V

ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay* – Ensaio Imunoenzimático Fluorescente

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima

FDA – *Food and Drug Administration*

femA – gene codificador do Fator Essencial para Resistência à Meticilina (*Factor Essential for Methicillin Resistance* - FEMA)

femB, **femX**, **femC**, **femD** e **femE**- genes codificadores do Fator Essencial para Resistência à Meticilina (*Factor Essential for Methicillin Resistance*)

g – grama

HNE – Hospedeiro Não Específico

KCl - Cloreto de Potássio

kDa – Kilodalton

LA - *Latex Agglutination* – Aglutinação em Látex

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina

mL - mililitro

NaCl – Cloreto de Sódio

ng – nanograma

n° - número

°C – graus Celsius

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeira de Polimerase

pg - picograma

pH - Potencial Hidrogeniônico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPLA - *Reversed Passive Latex Agglutination*

RT-qPCR – *Real Time Quantitative PCR* – PCR Quantitativo em Tempo Real

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

sar – gene acessório regulador de *Staphylococcus*

SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa

SCP – *Staphylococcus* Coagulase Positiva

SE - *Staphylococcus* Enterotoxigênico

sea – gene da enterotoxina A

seb – gene da enterotoxina B

sec – gene da enterotoxina C

sed – gene da enterotoxina D

see – gene da enterotoxina E

seg – gene da enterotoxina G

sei - – gene da enterotoxina I

sej – gene da enterotoxina J

sem - – gene da enterotoxina M

sen – gene da enterotoxina N

seo - – gene da enterotoxina O

ser – gene da enterotoxina R

seu - gene da enterotoxina U

UFC/g ou mL – Unidade Formadora de Colônia por grama ou por mililitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I - <i>Staphylococcus</i> em queijos: produção e detecção das enterotoxinas e seus genes – uma revisão – Artigo de Revisão.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
Queijo.....	14
<i>Staphylococcus</i> spp.	17
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxigênicos e as Enterotoxinas	18
Fatores que influenciam o crescimento em relação à produção das Enterotoxinas Estafilocócicas	19
Intoxicação Alimentar Estafilocócica	20
Surtos com Enterotoxinas Estafilocócicas	21
Metodologias analíticas	22
Produção de queijos, contaminação por <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas estafilocócicas	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO II - Ocorrência de genes de enterotoxinas estafilocócicas em queijo de coalho artesanal – Artigo.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	48
CONCLUSÃO GERAL	55
ANEXOS	56

INTRODUÇÃO GERAL

Os *Staphylococcus* Enterotoxigênicos (SE) apresentam um grande papel na produção de alimentos, pois são capazes de produzir toxinas em alimentos como os queijos, provocando sintomas de intoxicação alimentar na população que venha a consumir este alimento contaminado. Entender o processo de produção das Enterotoxinas Estafilocócicas (EE) em uma matriz tão complexa como os queijos é necessária para evitar essa contaminação. Deve ser destacada também a importância das metodologias analíticas para a identificação etiológica em surtos envolvendo queijos e EE e a confirmação pela presença dos genes que expressam as enterotoxinas nas estirpes isoladas.

No capítulo I consta uma revisão de literatura contendo informações sobre os SE, como eles se comportam em relação à produção das enterotoxinas no queijo e os fatores que influenciam essa produção destas. No capítulo II estão apresentados os resultados de pesquisa do isolamento e contagem de SCP e a identificação dos genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) em amostras de queijo de coalho artesanal coletados na região do Sertão da Paraíba através da técnica de PCR.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi revisar a literatura nacional e internacional sobre as características de SE no âmbito da expressão gênica e da produção das enterotoxinas em queijos. Também foi destacado a descrição dessas toxinas, as metodologias analíticas utilizadas para identificar e quantificar o agente etiológico e as toxinas envolvidas em intoxicações alimentares e surtos ocorridos no mundo provocadas por estes microrganismo, explorando o complexo mecanismo de enterotoxigênese durante a produção dos queijos.

Palavras-chave: toxinas estafilocócicas, queijos, produção

ABSTRACT

The objective of this study is to review the national and international literature to describe the characteristics of Enterotoxigenic *Staphylococcus* (ES) about the gene expression and production of enterotoxins in cheeses. It was also highlighted the description of these toxins, analytical methodologies used to identify the causal agent and to quantify the toxins involved in food poisoning and reported outbreaks in the world caused by these microorganisms, exploring the complex enterotoxigenesis mechanism for the production of cheeses.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, cheese, manufacture

CAPÍTULO I - *Staphylococcus* em queijos: produção e detecção das enterotoxinas e seus genes – uma revisão – Artigo de Revisão

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da revista Ciência Rural e submetido para publicação.

***Staphylococcus* em queijos: produção e detecção das enterotoxinas e seus genes –
uma revisão**

***Staphylococcus* in cheeses: production and detection of enterotoxin and their genes
- a review**

Amanda Chagas da Silva^I, Arthur Pombo de Almeida^{II}, Nara Geanne de Araújo
Medeiros^{II}, Sérgio Santos de Azevedo^{IV}, Maria das Graças Xavier de Carvalho^{IV}

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi revisar a literatura nacional e internacional para descrever as características de SE no âmbito da identificação gênica e da produção das enterotoxinas em queijos. Também foi destacado a descrição dessas toxinas, as metodologias analíticas utilizadas para identificar e quantificar o agente etiológico e as toxinas envolvidas em intoxicações alimentares e surtos ocorridos no mundo provocadas por este microrganismo, explorando o complexo mecanismo de enterotoxigenese durante a produção dos queijos.

Palavras-chave: *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Negativa, enterotoxinas estafilocócicas, produção de queijos, queijo artesanal.

ABSTRACT

The objective of this study is to review the national and international literature to describe the characteristics of *Staphylococcus* enterotoxigenic within the gene identification and production of enterotoxins in cheeses. Was also highlighted the description of these toxins, analytical methodologies used to identify the causal agent and quantify the toxins involved in food poisoning and reports outbreaks in the world caused by these microorganisms, exploring the complex enterotoxigenesis mechanism for the production of cheeses.

Keywords: Coagulase Positive and Negative *Staphylococcus*, staphylococcal enterotoxins, manufacture of cheese, artisanal cheese.

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil. E-mail: amanda.chs@gmail.com* Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^{IV}Departamento de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB, Brasil.

INTRODUÇÃO

Queijo é o nome genérico dado a um grupo de alimentos fermentados à base de leite e para a sua elaboração com qualidade, a obtenção da matéria-prima requer alguns cuidados. Além de ser fonte de bactérias lácticas, o leite cru, se não for obtido em condições adequadas de higiene, pode também veicular microrganismos patogênicos em queijos artesanais. Entretanto, a presença de patógenos em queijos elaborados com leite pasteurizado pode ser atribuída à contaminação pós-pasteurização (GRAPPIN et al., 1997).

Entre as bactérias patogênicas de maior ocorrência em queijos destacam-se espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) encontrados em uma ampla variedade de sabores e formas de queijos em todo o mundo. Essas bactérias, quando presentes em elevadas populações (10^5 - 10^6 UFC/ g ou mL) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e oxigênio), representam um problema de saúde pública pela habilidade de produzirem enterotoxinas e causar uma intoxicação alimentar estafilocócica (JABLONSKI et al., 2001).

Segundo DINGES et al. (2000), os SE são espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa, capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas quando presentes nos alimentos, os quais, depois de ingeridos, ocasionam intoxicação alimentar estafilocócica. As EE representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais. São nomeadas em ordem alfabética a partir da sua descoberta como clássicas: EEA, EEB, EEC, EED e EEE e não clássicas: EEG-EEV (THOMAS et al., 2007).

O queijo, por se tratar de uma matriz muito complexa, exige um entendimento mais aprofundado de quais parâmetros físico-químicos e microbiológicos influenciam na proliferação dos SE e na produção dessas enterotoxinas. O objetivo deste trabalho foi de descrever as características de SE em queijos e como estes se comporta nessa matriz e nos surtos que envolvem estes patógenos.

Queijo

Queijo é o nome genérico dado a um grupo de alimentos fermentados à base de leite e produzido em uma ampla variedade de sabores e formas em todo o mundo. Embora o objetivo primordial do queijo seja conservar os principais constituintes do

leite, ele evoluiu, tornando-se um alimento da alta gastronomia com qualidades peculiares, além de ser altamente nutritivo (FOX et al., 2004).

Dentre as hipóteses sobre a descoberta do queijo, a mais considerada relaciona o uso de recipientes ou sacos feitos com partes de estômagos de animais, onde o leite era transportado e guardado. O contato do leite com as enzimas liberadas pelo estômago desses animais promovia sua coagulação, gerando uma massa branca de sabor agradável. Na produção de queijos, são necessários quatro ingredientes básicos e essenciais: leite, enzimas coagulantes, sal e microrganismos, além de etapas fundamentais, tais como a acidificação, coagulação, sinérese (dessoragem) e maturação. A combinação única de ingredientes e parâmetros de processamento leva a obtenção de tipos específicos de queijos com propriedades peculiares (FOX et al., 2000).

No Brasil, a origem do queijo data do período colonial, em meados do século XVIII, época da mineração do ouro, quando os portugueses trouxeram para o Estado de Minas Gerais uma legião de garimpeiros que fabricavam o queijo para consumo próprio, na tentativa de imitar o famoso queijo português Serra da Estrela. Diferenças ambientais como clima, relevo e pastagens, além de ingredientes adaptados da própria região, como o tipo de coalho e fermentos utilizados, diferiram muito o queijo Minas do Serra da Estrela. Dentre os vários queijos produzidos artesanalmente, destacam-se aqueles que já se tornaram conhecidos como típicos de determinadas regiões ou Estados e/ ou cujos nomes são associados a um tipo de queijo específico. Assim, a denominação dos queijos muitas vezes é ligada ao nome do município de sua origem ou ao seu local de maior produção. Com o desenvolvimento tecnológico da produção de queijo no Brasil, foram surgindo diversas variedades, algumas de expressão regional como os queijos artesanais queijo de coalho de manteiga produzidos no Nordeste, Serro, Canastra, Minas, Araxá e Salitre produzidos em Minas Gerais (NASSU et al., 2001; PINTO, 2004).

Em virtude da produção em grande escala e das vastas áreas de produção, os queijos artesanais, principalmente na Europa, têm grande importância social e econômica em vários países. Na Europa e no Brasil, ainda existem regiões onde os queijos são fabricados de maneira tradicional; estes se destacam no mercado por conservar sabor e aroma característicos que muitos consumidores dizem ter

desaparecido nos produtos industrializados (CAPLICE et al., 1999; LIMA FILHO et al., 2010).

O queijo Minas artesanal é provavelmente o mais antigo e tradicional queijo brasileiro. De acordo com a Lei Estadual Nº 14.185 de janeiro de 2002, o queijo Minas artesanal é todo queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do estado onde for produzido, a partir do leite integral da vaca, fresco e cru, sem nenhum tratamento térmico, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corante e conservantes. Está presente em mais de 600 dos 853 municípios do estado, sendo principalmente representados por cinco principais regiões tradicionais como do Serro, Cerrado, Araxá, Serra da Canastra e Campos das Vertentes (FURTADO et al., 1994; BELO HORIZONTE-MG, 2002; FERREIRA, 2002; EMATER, 2004;).

Já na região Nordeste, a atividade de produção artesanal dos queijos de Coalho e Manteiga é expressiva para a economia regional e constitui uma fração relevante na economia, principalmente nos Estados de Alagoas, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco, sendo significativo nos rendimentos dos produtores de leite, representando uma fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais (PIRES et al., 1994; SEBRAE/CE, 1998)

Para a elaboração de um queijo artesanal de qualidade, a obtenção da matéria-prima requer alguns cuidados. Além de ser fonte de bactérias lácticas, o leite cru, se não for obtido sob condições adequadas de higiene, pode veicular microrganismos patogênicos em queijos artesanais. Entretanto, a presença de patógenos em queijos elaborados com leite pasteurizado pode ser atribuída à contaminação pós-pasteurização (FOX et al., 2004).

De acordo com GRAPPIN et al. (1997), entre as bactérias patogênicas de maior ocorrência em queijos destacam-se espécies de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*. Essas bactérias, quando presentes em elevadas populações (10^5 - 10^6 UFC/g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O_2), representam um problema de saúde pública pela habilidade de produzirem enterotoxinas e causar intoxicação alimentar estafilocócica.

***Staphylococcus* spp.**

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos, esféricos com 0,5 a 1,5µm de diâmetro, apresentando-se isolados, aos pares, em tétrades ou em forma de cachos de uva. São mesófilos, tolerantes a concentrações salinas que variam entre 10 % a 20 %, crescem na faixa de pH de 4 a 9,8 e possuem a capacidade de crescerem em valores baixos de atividade de água (0,83 – 0,86). São ubíquos no ambiente e podem ser encontrados no ar, na poeira, em esgotos, água, superfícies ambientais, humanos e animais. São tipicamente encapsulados ou com formação de cápsula limitada, usualmente catalase positiva, não apresentam motilidade e nem produzem esporos, sendo os mesmos classificados como anaeróbios facultativos, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius* (BANNERMAN, 2003; FRANCO et al., 2004).

Até o momento, mais de 50 espécies de *Staphylococcus* já foram descritas. A classificação os difere entre *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN). Entre as espécies coagulase positiva, estão *S. aureus* subespécie *aureus*, *S. aureus* subespécie *anaerobius*, *S. schleiferii* subespécie *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. lutrae*. A espécie *S. aureus* é a mais relacionada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem exotoxinas superantigênicas como as enterotoxinas (DINGES et al., 2000). Outras espécies produtoras de coagulase, como *S. intermedius* (BECKER et al., 2001) e *S. hyicus* (ADESIYUN et al., 1984), também produzem enterotoxinas.

A produção de enterotoxinas por SCN não produtores de coagulase, tais como *S. capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. chromogenes* têm sido relatada em vários estudos, sendo a maioria sob condições de laboratório (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; CHENG-CHUN; LIFEN, 1997; PEREIRA et al., 2001). Entre os SCN, algumas espécies são conhecidas por terem um importante papel na fermentação de produtos lácteos e são considerados de qualidade alimentar, tais como o *S. equorum*, *S. caprae*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri* e *S. succinus* subsp. *casei* que estão frequentemente envolvidos na maturação em vários tipos de queijos. Em especial, o *S. equorum* subsp. *linens*, *S. succinus* subsp. *casei* são também utilizados como cultura *starter* em queijos curados e típicos queijos semi-duros

suíço (IRLINGER et al., 1997; BOCKELMANN et al., 1997; HOPPE-SEYLER et al., 2000; BOCKELMANN et al., 2001; BOCKELMANN, 2002; PLACE et al., 2003)

Ainda existe uma controvérsia na literatura a respeito dos SCN serem responsáveis por surtos apesar de autores como ROSEC et al. (2002), CARMO et al., (2002) e VERAS et al. (2008) já relatarem essa condição. Vernozy- Rozand et al. (1996) forneceu três condições que são necessárias para provar que cepas SCN são produtoras de EE: a correta identificação da cepa; confirmação da produção de EE por pelo menos dois testes imunológicos e a identificação do gene da EE. Entretanto, são poucos os estudos que demonstram essas três condições (ORDEN et al., 1992; VERNOZY-ROSAND et al., 1996). Como as cepas SCP possuem mais atenção em surtos pelo mundo por serem mais patogênicas, será dada uma atenção maior a este grupo, principalmente ao *S. aureus*, sendo este mais descrito como o agente responsável em surtos por intoxicação alimentar estafilocócica.

Os *Staphylococcus* spp. estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios. Geralmente, são encontrados nos pelos, pele, boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal destes hospedeiros. Certas espécies desse gênero são frequentemente consideradas agente etiológico de diversas infecções em humanos e animais. Vários biótipos já foram isolados a partir de diferentes hospedeiros (humanos, aves, bovinos, ovinos e caprinos), demonstrando a estreita adaptação da bactéria para o seu hospedeiro. No entanto, em muitas estirpes não pode ser atribuído a estes biótipos o hospedeiro-específico e estes pertencem a biótipos sem hospedeiro específico, ou seja, os que estão associados com vários hospedeiros. Animais leiteiros em caso de mastite, transporte humano durante o processamento de alimentos e tratamento físico são consideradas as principais fontes de contaminação do leite e dos produtos lácteos. A patogenicidade do *S. aureus* depende da habilidade da estirpe em sobreviver e se multiplicar em uma variedade de condições e em casos de surtos alimentares por SE e produzir EE em alimentos (DEVRIESE, 1984; BANNERMAN, 2003).

***Staphylococcus* Enterotoxigênicos e as Enterotoxinas**

DIGNES et al. (2000) define os SE como espécies de *Staphylococcus*, coagulase positiva ou negativa, capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas quando presentes nos alimentos, os quais, depois de ingeridos, ocasionam intoxicação alimentar

estafilocócica. A capacidade de produção de enterotoxinas tem sido relacionada com produção da enzima coagulase por SCP, principalmente pela espécie *S. aureus*. Esta espécie está mais relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade que muitas de suas cepas têm de produzir exotoxinas superantigênicas, como as enterotoxinas.

As EE representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais. Essas constituem um grupo de proteínas de cadeia simples de baixa massa molar. Os aminoácidos que as compõem são similares em alguns aspectos, como: alto teor de lisina, ácido aspártico e tirosina. As SE são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Já foram descritos mais de 22 tipos de enterotoxinas distintas. Essas enterotoxinas são classificadas em clássicas: A (EEA), B (EEB), C1 (EEC1), C2 (EEC2), C3 (EEC3), D (EED), E (EEE), e não clássicas: G (EEG), H (EEH), I (EEI), J (EE/J) K (EE/K) L (EE/L), M (EE/M), N (EE/N), O (EE/O), P (EE/P), Q (EE/Q), R (EER), S (EES), T (EET), U (EE/U), U2 (EE/U2) e V (EEV) (BALABAN et al., 2000; LE LOIR et al., 2003; THOMAS et al., 2007). Estas toxinas (enterotoxinas e enterotoxinas-like) são proteínas globulares de cadeia simples com pesos moleculares variando entre 22 a 29 kDa. São resistentes às condições ambientais (congelamento, desidratação, tratamento térmico e baixo pH) e resistentes às enzimas proteolíticas mantendo sua atividade no trato digestivo após a ingestão (THOMAS et al., 2007).

Fatores que influenciam o crescimento em relação à produção das Enterotoxinas Estafilocócicas

O crescimento de SE em alimentos é afetado por vários parâmetros (intrínsecos e extrínsecos) e também pelo processamento na produção dos queijos. São descritos os principais parâmetros que influenciam diretamente na multiplicação destas. Na Tabela 1 estão relacionados alguns desses parâmetros.

Os factores intrínsecos (temperatura, pH, atividade da água, porcentagem de NaCl, potencial de oxidação e atmosfera) e factores externos de processamento e armazenamento (refrigeração, embalagem e umidade) dos queijos desempenham um papel importante na sobrevivência, crescimento e produção de enterotoxina em diferentes alimentos dos *Staphylococcus* (GENIGEORGIS, 1989). Entendendo a regulação da produção de enterotoxina estafilocócica como ocorre em alimentos é

particularmente crítica como SCHELIN et al. (2011) apontou que esse processo é muito diferente em alimentos quando comparado com culturas puras de *S. aureus* e há casos em que o crescimento e a produção de toxinas podem ser dissociados (GUSTAFSON et al., 2015).

Em experimento realizado por CRETENET et al. (2011), estes relataram um crescimento de *S. aureus* nas primeiras 48-72 horas do processo industrial e, em seguida, uma diminuição no queijo (devido à forma não-aeróbica e / ou competição com o ecossistema do queijo). Entretanto, no crescimento foi observada a produção das EE tanto em queijos de massa mole e/ou curados. Em todos os casos, as EE persistiram nos produtos finais. Concluindo, queijos de leite cru, como os queijos semi-rígido ou queijos macios são os mais sensíveis.

Intoxicação Alimentar Estafilocócica

Para uma intoxicação alimentar estafilocócica acontecer, quatro fatores relacionados ao alimento devem ser considerados: estar contaminado com estafilococos produtores de EE; apresentar condições intrínsecas para a multiplicação do microrganismo; estar acondicionado à uma temperatura e por um período adequados à multiplicação bacteriana até níveis capazes de produzir EE em quantidade suficiente para causar doença; e ser consumido (NEWSOME et al., 1988).

MURRAY (2005) descreve os sintomas iniciais por uma intoxicação alimentar estafilocócica com náusea seguida por vômitos em jatos em torno de 30 minutos a oito horas após a ingestão do alimento contaminado. Os outros sintomas são dor abdominal, diarreia, tontura, tremores e fraqueza generalizada, às vezes associada com uma febre moderada. Em casos mais severos, dor de cabeça, prostração e pressão baixas são reportados. Geralmente a melhora acontece de 24 a 48 horas sem tratamento específico, enquanto a diarreia e a fraqueza generalizada demoram 24 horas ou um pouco mais para desaparecer. Óbitos são raros (0,02 %), acometendo pessoas mais susceptíveis à desidratação como crianças, idosos e pessoas debilitadas.

A intoxicação alimentar estafilocócica, por ser uma doença de curso rápido (24-48 horas), e os indivíduos afetados, geralmente, não necessitem de atendimento médico, a maioria dos casos não é notificada aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que

leva à subnotificação da doença no Brasil, bem como em outros países (BORGES, 2006).

Surtos com Enterotoxinas Estafilocócicas

Em Outubro de 2014, alunos e funcionários de uma creche foram intoxicados pelo consumo do queijo tipo *Tomme* contaminado com *S. aureus* do biótipo bovino com produção da EEA (> 6 ng de EEA/g de queijo) e altos níveis de EED (> 200 ng de EED/g de queijo). As contagens dos SCP foram de 10^7 CFU/g de queijo. As três estirpes que estavam presentes com contagens de >10⁶ UFC/g continham os genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*, mas uma estirpe (SA_1), além de possuir os genes *sej* e *ser*, foram encontrados também os genes das enterotoxinas clássicas *sea* e *sed*, sendo ela identificada assim a fonte do surto (JOHLER et al., 2015).

Em 2014, outra intoxicação alimentar estafilocócica foi causada por um queijo *Formagella d'alpe* feito de leite caprino cru na Suíça. Após seis horas da ingestão do alimento, os sintomas clássicos da intoxicação começaram (náuseas e vômitos). Para a pesquisa da presença das enterotoxinas clássicas (EEA-EEE) utilizando o mini Vidas SET2 (técnica que utiliza o Imunoensaio de Enzima Ligada Fluorescente - *Enzyme-linked Fluorescent Immunoassay* - ELFA), os resultados foram negativos. A contagem geral de SCP foi de $2,6 \times 10^3$ UFC/g. Das quatro cepas isoladas, três apresentaram os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo* (JOHLER et al., 2015).

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. A confirmação do surto foi realizada através da pesquisa da produção da EEE (quantidades > 1,14 ng/g de queijo) e a presença do gene *see* pelo PCR.

No Estado de Minas Gerais, em um levantamento de surtos e casos de intoxicação alimentar entre os anos de 2006 a 2008, notificaram 139 surtos, destes 46 % foram confirmados como intoxicação alimentar estafilocócica, onde foi detectada a presença de linhagens enterotoxigênicas de SCP (> 10^5 UFC/g) e de enterotoxinas nas sobras dos alimentos consumidos, predominando as linhagens produtoras de EEA seguida da EEC e EEB.²⁸ No Estado da Paraíba, entre o ano de 2004 e o início de 2008, foram identificados 42 casos de surtos em alimentos, envolvendo 481 doentes. Destes surtos, 23,8 % estavam relacionados a queijos. O agente etiológico *S. aureus* foi

responsável por 50 % das contaminações dos queijos, seguido de *Escherichia coli* (20 %) e *Clostridium perfringens* (10 %), sendo ignorado o agente etiológico em 20 % dos casos (DIAS et al., 2008; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2009).

Metodologias analíticas

As metodologias analíticas são ferramentas indispensáveis no auxílio da identificação do agente etiológico como também na identificação e quantificação das EE envolvidas em intoxicações alimentar estafilocócica. Dentre estas metodologias, estão os bioensaios que são baseados na capacidade do extrato de um alimento suspeito induzir sintomas gastrointestinais tais como vômito em animais e/ou ação superantigênica em culturas celulares. Historicamente, as EE têm sido detectadas baseado na sua atividade emética em macacos (por via oral) e filhotes de gatos (intraperitoneal) e mais recentemente, usando outros modelos animais como o roedor *Musk Shrew - Suncus murinus*. Este roedor em estudos anteriores tem sido descrito como um modelo animal apropriado para pesquisa de resposta emética tanto com medicamentos como também com a administração da EEA por via oral e intraperitoneal. Mas devido aos testes com animais em laboratório estar restrito por questões éticas, os bioensaios não são sensíveis (diferenças de dosagens para diferentes espécies animais além da resposta diferenciada de cada indivíduo em uma mesma espécie como os primatas, por exemplo) o bastante para assegurar a segurança alimentar dos consumidores e além do mais, métodos alternativos para detecção das EE têm se desenvolvido bastante (SURGALLA, BERGDOLL e DACK, 1953; BERGDOLL, SURGALLA e DACK, 1959; OKADA et al., 1994; HU et al., 1999; HU et al., 2003; ONO et al., 2008).

Nos métodos rápidos imunológicos, os principais disponíveis no mercado, para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e em extratos de alimentos, são kits imunoenzimáticos que, em sua maioria, utilizam o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA – Ensaio Imunoenzimático); *Latex Agglutination* (LA – Aglutinação em Látex); *Reversed Passive Latex Agglutination* (RPLA - Aglutinação Passiva Reversa em Látex) e ELFA. Entre os principais kits incluem-se: SET-RPLA (Oxoid); BOMMELI SET-EIA (Dr. Bommeli AG); TECRA SET-VIA (Bio-Enterprises Pty Ltd); RIDASCREEN SET (R-Biopharm GmbH); TRANSIA e o VIDAS® Staph enterotoxin – SET (BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France). Apesar da praticidade, somente anticorpos contra as EEA a

EEE, EEG, EEH e EEIQ estão disponíveis. As outras EE não são detectadas, o que poderia explicar em parte porque alguns surtos continuam sem identificação etiológica ou das EE (BRETT, 1998; PIMBLEY et al. PATEL, 1998; SCHIEVERT et al., 2007).

Devido a algumas conveniências e inconveniências com os métodos de detecção disponíveis atualmente (Tabela 2) como falsos positivos e negativos, custos e pouca sensibilidade de alguns teste além da falta de anticorpos disponíveis contra as EE recém descritas, outras estratégias baseadas em técnicas físico-químicas têm sido desenvolvidas. A Espectrometria de Massas é a técnica mais sensível atualmente disponível porque proporciona uma quantificação analítica específica, rápida e confiável da quantidade de EE. No caso da análise em alimentos, a preparação da amostra continua a ser o passo crítico pois a matriz pode conter muitas moléculas que interferem com a detecção do alvo, podendo distorcer a quantificação. Várias tentativas têm sido avaliadas para melhorar esta etapa, otimizando os parâmetros de digestão ou adicionando passo de purificação. A estratégia de incorporação de um padrão interno isotopicamente marcado nas amostras foi também desenvolvido. A espectrometria de massas superou limitações técnicas específicas do ELISA para a caracterização das EE, entretanto, além do problema da extração, o custo das análises de um para o outro ainda é desfavorável (650 versus 280 euros) (BRU et al., 2007).

HENNEKINNE, et al. (2012) citam o PCR, este que é um método de biologia molecular, é amplamente utilizado para detectar genes que codificam enterotoxinas em estirpes de SE isolados de alimentos contaminados. No entanto, esse método tem duas limitações principais: as estirpes de *Staphylococcus* devem ser isoladas a partir de alimentos e os resultados somente informam quanto à presença ou ausência de genes que codificam as EE, mas não proporcionam qualquer informação sobre a expressão destes genes em alimentos durante o processamento e estocagem. Este método não é recomendado como único método de confirmação do *S. aureus*, por exemplo, como o agente etiológico em surtos mas permite a caracterização destas cepas.

No entanto, a abordagem de PCR é um método específico, altamente sensível e rápido que pode caracterizar as estirpes de *S. aureus* envolvidos na intoxicação alimentar estafilocócica, fornecendo assim informações altamente valiosas. Em surtos descritos por Ostin et al. (2010), a EEE foi encontrada em queijos de massa mole em

um surto na França e o gene *see* estava presente nas estirpes de *S. aureus* isolados. Em tal caso, a determinação do gene auxiliou na confirmação do papel de uma EE no surto.

Após um surto ocorrido no Japão, onde mais de 10.000 pessoas foram intoxicadas com leite reconstituído, Ikeda et al. (2005) desenvolveram uma PCR com a técnica baseada na detecção direta dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, e *sei*. Os genes *sea* e *seh* foram detectados em 10 amostras e os *seg* e *sei* foram detectados em sete amostras de leite em pó que foi a fonte da contaminação do leite reconstituído incriminado no surto. Os pesquisadores não conseguiram isolar o agente etiológico (*S. aureus*) diretamente do leite em pó em função deste passar por um processamento térmico de 130°C por três segundos.

DUQUENNE et al. (2010) desenvolveram um método eficiente para a extração de RNA bacteriano de forma acessível para o PCR Quantitativo em Tempo Real (*Real Time Quantitative PCR* - RT-qPCR) em queijo, sendo um método simples, sensível e reprodutível para avaliar o nível de transcrição relativa da expressão gênica das EE durante a fabricação do queijo.

Produção de queijos, contaminação por *S. aureus* e produção de enterotoxinas estafilocócicas

Comparando o risco de contaminação com outros patógenos como a *Salmonella* ou *Listeria*, a intoxicação alimentar estafilocócica necessita de um entendimento mais aprofundado devido à produção das EE pelo *S. aureus*. A fabricação do queijo é um processo fermentativo que envolve várias etapas que afetam o ecossistema microbiano através de muitas variações (leite utilizado de diferentes espécies animais, tipo de coalho, acidez, tempo de maturação, porcentagem de NaCl), tornando a matriz de queijo um ambiente dinâmico e em constante evolução. As diferentes tecnologias de queijo apresentam parâmetros físico-químicos e uma microbiota mais ou menos permissiva para o crescimento de *S. aureus* (Tabela 3) (HENNEKINNE et al., 2013).

Segundo ZEHREN et al. (1968), *S. aureus* é capaz de crescer e produzir EE em todos os tipos de queijos, incluindo, em casos raros, queijos de massa cozida. Observa-se que os principais fatores relacionados aos queijos que prejudicam o crescimento do *S. aureus* e da produção de EE são o pH e acidez titulável, o que depende muito da atividade da cultura *starter*. A maioria dos trabalhos relatam o crescimento do *S. aureus*

nas primeiras 48-72 h do processamento industrial e em seguida, acontece uma diminuição nos queijos (atmosfera anaeróbica e/ou competição com o ecossistema do queijo com por exemplo em queijos azuis o *Penicillium roqueforti*). Entretanto, as EE persistem até o produto final. Os queijos produzidos de leite cru assim como os semirrígidos ou macios são os mais sensíveis.

Em um estudo feito por CRETENET et al. (2011), a presença das BAL aparentam limitar o crescimento do *S. aureus* e inibe de alguma forma a produção das EE. O mecanismo deste antagonismo ainda não foi bem esclarecido. Utilizando técnicas baseadas em microarranjos de DNA para estudar as interações entre as BAL e o *S. aureus* em queijos, foi observado que as BAL prejudicam a expressão do fator de virulência do *S. aureus*. O efeito inibidor pode ser mediado pela inibição do gene *agr*-independente, limitando supostamente o crescimento de *S. aureus* e inibindo a produção de EE.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O comportamento dos SE em queijos é muito peculiar. A produção das EE em alimentos ainda é pouco conhecida, o efeito dos parâmetros como o pH, oxigênio e flora competidora ainda são de difícil entendimento quando se refere à produção de queijos. Estudos mais aprofundados na área são necessários para assim evitar a contaminação e proliferação de estirpes produtoras de enterotoxinas.

REFERÊNCIAS

ADESIYUN, A. A. et al. Productions of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 487-495, Sept., 1984. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6495609> Acesso em: 14 de Abril de 2015. doi: [10.1016/0378-1135\(84\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90069-5)

BALABAN N. et al. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 01, p. 01-10. 2000.

BANNERMAN T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive *Coci* that grow aerobically. In: Murray P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8ª ed.. Washington DC, ASM, 2003.

BECKER, K. et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, Dec., 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472->

[765X.2002.01166.x/full](#)> Acesso em 20 de Fevereiro de 2015. doi: [10.1128/AEM.67.12.5551-5557.2001](#)

BERGDOLL M.S. et al. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **The Journal of Immunology**, v. 83, n. 03, p. 334-338, 1959. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/83/3/334.full>>. Acesso em 13 de Dezembro de 2014. doi:

BOCKELMANN, W. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. **International Dairy Journal** v. 12, n. 2–3, p. 123–131, 2002. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/els/09586946/2002/00000012/00000002/art00152>> Acessado em 13 de Dezembro de 2014. doi: [10.1016/S0958-6946\(01\)00152-2](#)

BOCKELMANN, W. et al. The microflora of Tilsit cheese. Part 2. **Development of a surface smear starter culture**. *Nahrung* v. 41, p. 213–218, 1997.

BOCKELMANN, W. et al. The surface flora of bacterial smear ripened cheeses from cow's and goat's milk. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 307–314, 2001. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/els/09586946/2001/00000011/00000004/art00060>> Acessado em: 12 de Fevereiro de 2014. doi:

BORGES MF, **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 2006, 221f. Tese de doutorado. Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas.

BRETT, M. M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, London, v. 84, n. S1, p. 110S-118S, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.0840s1110S.x/pdf>> Acesso em: 20 de Julho de 2014.

BRU, V. et al. Isotopelabeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. **Molecular Cell Proteomics**, v. 06, p. 2139-2149, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848587> Acesso em: 03 de Junho de 2014.

CAPLICE, E. et al. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CARMO L.S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 01, p. 09-14, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002001904447>> Acesso em: 14 de Fevereiro de 2014. doi: [10.1006/fmic.2001.0444](#)

CHENG-CHUN et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase-negative strain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 923–927, Aug. 1997. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000008/art00008>>. Acesso em: 20 de Junho de 2014.

CRETENET M. et al. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. **Environment Microbiology Reports**. v. 03, p. 340-351, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x/full>> Acesso em: 12 de Janeiro de 2015. doi: [10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x)

DEVRIESE L.A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 56, p. 215–220, 1984. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01341.x/full>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2014. doi: [10.1111/j.1365-2672.1984.tb01341.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01341.x)

DIAS, R.S. et al. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de linhagens enterotoxigênicas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. **Revista da Fundação Ezequiel Dias**, v. 03, n. 02, p. 37-44, 2008.

DINGES M M. et al. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, n. 01, p. 16-34, 2000. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/13/1/16.full>>. Acesso em: 25 de Março de 2015.

DUQUENNE M, et al. A Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. **Applied Environment Microbiologic**, v. 76, p. 1367-1374, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832361/>>. Acesso em: 27 de Março de 2015. doi: [10.1128/AEM.01736-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01736-09)

EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. **Revista da EMATER-MG**. Ano XXII – v. 80, p. 8-9, 2004.

FERREIRA, C. L. L. F. Queijo: Mineiros tentam ajustar modernidade e produção artesanal. **Revista Globo Rural**, v. 200, n. 17, p. 41, 2002.

FOX P.F. et al. Cheese: An Overview. In: Fox P.F. et al. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2ª ed. London (UK): Academic Press, 2004.

FOX P.F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., Cap. 5. p. 54-97, 2000.

FRANCO B.D. et al. **Microbiologia dos Alimentos**. 1ª ed. São Paulo, Editora Atheneu; 2004.

FURTADO, M. M. et al. **Tecnologia de Queijos - Manual técnico para produção industrial de queijos**. 1 ed. São Paulo-SP: Editora Dipemar Ltda, 1994

GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, v. 09, p. 327-360, 1989.

GRAPPIN R. et al. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 07, n. 12, p. 751-871, 1997.

HENNEKINNE, J. A. et al.. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews** v. 36, p. 815-836, 2012. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091892> >. Acesso em: 15 de Maio de 2014. doi: [10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x)

HENNEKINNE, H. A. **Staphylococcal enterotoxin production and detection in cheese**. In:___ Handbook of cheese in health: production, nutrition and medical sciences Human Health Handbooks no. 6. V. R. Preedy, R. R. Watson and V. B. Patel (eds.)-, ©Wageningen Academic Publishers 2013. doi <[10.3920/978-90-8686-766-0_26](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-766-0_26)> . Acesso em: 18 de Maio de 2014.

HOPPE-SEYLER, T. et al.. Quantification and identification of microorganisms from the surface smear cheeses. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 52, p. 294–305, 2000.

HU, D. L. et al.. Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by per oral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1350–1353, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC143409/>> . Acesso em: 14 de Janeiro de 2015.

HU D.L. et al. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). **Infection and Immunity**, v. 71, p. 567–570, 2003. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/71/1/567.full>>. Acesso em: 23 de Agosto de 2014. doi: [10.1128/IAI.71.1.567-570.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.567-570.2003)

IKEDA T. et al. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2793–2795, 2005. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/71/5/2793.full>> . Acesso em: 14 de Janeiro de 2015. doi: [10.1128/AEM.71.5.2793-2795.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2793-2795.2005)

IRLINGER, F. et al.. Taxonomic characterisation of coagulase-negative *Staphylococci* in ripening flora from traditional french cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 319–328, 1997.

JABLONSKI L.M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. 2ª ed. **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. Washington DC: ASM, 2001.

JOHLER S. et al. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by *egc*-encoded enterotoxins. **Toxins**, v. 07, p. 997-1004, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/7/3/997>> . Acesso em: 12 de Agosto de 2015. doi: [10.3390/toxins7030997](https://doi.org/10.3390/toxins7030997)

JOHLER S. et al. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-5, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726108>> . Acesso em: 12 de Agosto de 2015. doi: [10.3168/jds.2014-912](https://doi.org/10.3168/jds.2014-912)

GUSTAFSON E. J. et al. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review, **Food Control**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.016>>. Acesso em: 12 de Agosto de 2015. doi: [10.1016/j.foodcont.2014.10.016](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.016)

LE LOIR, Y. et al.. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 02, n. 01, p. 63-76, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917803>> . Acesso em: 13 de Abril de 2015.

LEI ESTADUAL/MG Nº 14.185, de 31 de Janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá Outras Providências**. Belo Horizonte, 2002.

LIMA FILHO, R. R. et al. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite**, v. 6, n. 105, 2010.

MURRAY R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **International Medicine Journal**, v. 35, p. S106-S119, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1444-0903.2005.00984.x/abstract>> . Acesso em: 18 de Agosto de 2015. doi: [10.1111/j.1444-0903.2005.00984.x](https://doi.org/10.1111/j.1444-0903.2005.00984.x)

NASSU R.T. et al. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, 2001, v. 15, n. 89, p. 28-36, 2001.

NEWSOME R.L. et al. **Bacteria Associated with Foodborne Diseases**. Disponível em: <http://www.ift.org/~media/Knowledge%20Center/Science%20Reports/Scientific%20Status%20Summaries/bacteriafoodborne_0704.pdf>. Acesso em 16 de Maio de 2015.

OKADA, F. et al.. Antiemetic effects of serotonergic 5-HT1A-receptor agonists in *Suncus murinus*, **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 64, p. 109–114, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8028227>> . Acesso em: 14 de Janeiro de 2015.

ONO H.K. et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 4999–5005, 2008. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/76/11/4999.full>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2015. doi: [10.1128/IAI.00045-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08)

ORDEN, J.A. et al. Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4083–4085, 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1476449>>. Acesso em: 17 de Abril de 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS; 2009. Disponível em: < http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guias_para_gerenciamento_riscos_sanitarios_em_alimentos.pdf> . Acesso em: 15 de Dezembro de 2014.

OSTYN A. et al. First evidence of a food-poisoning due to staphylococcal enterotoxin type E in France. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 13, p. 19528, 2010. Disponível em: < <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19528>>. Acesso em: 27 de Agosto de 2015.

PEREIRA, M. L. et al. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 5, p. 559-561, 1996. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000005/art00021>> . Acesso em: 25 de Agosto de 2015.

PIMBLEY D.W. et al. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**; v. 84, n. S1, p. 98S-109S, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.0840s198S.x/full>> . Acesso em: 13 de Fevereiro de 2015. doi: [10.1046/j.1365-2672.1998.0840s198S.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.0840s198S.x)

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal do Serro – MG**. 2004, 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PIRES, E. F. Et et al. **Queijo de Coalho - Perfil industrial**. Recife: SEBRAE/PE, v. 1, p. 44, 1994.

PLACE, R.B. et al. *Staphylococcus succinus* subsp.*casei* subsp.*nov.*, a dominant isolate from a surface ripened cheese. **Systematic and Applied Microbiology** v. 25, p. 353–359, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421073>>. Acesso em: 18 de Junho de 2015.

PLACE, R.B. et al. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. *nov.*, a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. **Systematic and Applied Microbiology** v. 26, p. 30–37, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004701563>> . Acesso em: 25 de Junho de 2015.

ROSEC, J.P. et al. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**; v. 77, n. ½, p. 61-70, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502000442>> . Acesso em: 26 de Agosto de 2015. doi: [10.1016/S0168-1605\(02\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00044-2)

ROZAND-VERNOZY C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative *staphylococci* isolated from goats milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271–280, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059600952X> >. Acesso em: 28 de Setembro de 2014. doi: [10.1016/0168-1605\(96\)00952-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00952-X)

SANTILIANO, F. C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET, Londrina**, v. 5, n. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011. Disponível em: < <http://www.pubvet.com.br/uploads/a7f7b9d75e808ad13bb3154c006a5347.pdf>> . Acesso em: 18 de Abril de 2015.

SCHELIN, J. et al. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 02, p. 580-592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030860>> . Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015. doi: [10.4161/viru.2.6.18122](https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18122)

SCHLIEVERT P.M. et al. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. **Methods of Molecular Biology**, v. 391, p. 113-126, 2007. Disponível em: < http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-59745-468-1_9> . Acesso em: 24 de Maio de 2015.

SEBRAE/CE. **Projeto de melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no estado do Ceará**. Séries Estudos Tecnológicos. Fortaleza, v. 208, p. 54-56, 1998.

SURGALLA M. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 41, p. 782–788, 1953. Disponível em: < <http://www.translationalres.com/article/0022-2143%2853%2990015-8/full> > . Acesso em: 26 de Maio de 2015.

THOMAS, D. et al. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 93, p. 24–41, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369698>> . Acesso em: 24 de Abril de 2015. doi: [10.1159/000100856](https://doi.org/10.1159/000100856)

VERAS J.F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971207002305>> . Acesso em: 15 de Abril de 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.018>

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-378, Mar., 1996. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8854188>> . Acesso em: 18 de Fevereiro de 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00953-1](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00953-1)

ZEHREN V. L. et al. Relation of acid development during cheesemaking to development of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p. 645-649, 1968. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030268870481>> . Acesso em: 15 de Abril de 2015. doi: [1-s2.0-0168160589901001-main.pdf](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00953-1)

Tabela 1 – Fatores intrínsecos que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*.

Crescimento do organism			Produção de enterotoxinas estafilocócicas	
Fator	Ótimo	Limite	Ótimo	Limite
Temperatura (°C)	37	7-48	37-45	10-45
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Atividade da água (aw)	0,98	0,83-0,99	0,98	0,85-0,99
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Potencial de Redução	> +200 mV	< -200 mV a > -200 mV	> +200 mV	< -100 mV a > +200mV
Atmosfera	Aeróbica	Anaróbica-aeróbica	Aeróbica (5-20% de O ₂ dissolvido)	Anaeróbica-aeróbica

(Adaptada de HENNEKINNE, 2013)

Tabela 2 - Características dos principais métodos de detecção de enterotoxinas

Método de detecção	Vantagens	Desvantagem	Sensibilidade	Especificidade	Custo por amostra	Tempo necessário
Ouchterlony e variações	Aprovada pela AOAC e adotada pela FDA	É subjetivo	100 ng/mL	Tipagem	Baixo	18-72 horas
ELISA kits diagnósticos	Sensibilidade	Não distingue proteína A produzida pelo <i>S. aureus</i>	0,2 ng/mL	Tipagem	Moderado	1,5 a quatro horas
Radioimuno-ensaio	Sensibilidade	Utiliza material radioativo	01 ng/mL	Tipagem	Moderado	Três a quatro horas
Western blot	Há solubilização de agregados	Necessidade de equipamentos exclusivos	100 pg/ mL	Tipagem	Moderado	Quatro a seis horas
Aglutinação em látex	Rápido	É subjetivo	2,5 ng/ mL	Tipagem	Baixo	20 minutos
Microarranjo	Sistematização	Exigem profissional qualificado	100 pg/mL	Tipagem	Alto	1,5 horas
PCR	Sensível e altamente específico	Exige profissional qualificado, a presença do gene não é necessariamente indicativa da presença da proteína	1 pg	Todos os genes	Alto	Quatro a seis horas
Bioensaio	É possível visualizar o efeito causado pela toxina	Utiliza um animal por amostra e/ou células	10 pg	Inespecífico	Alto	15 minutos a seis horas

(Adaptada de SANTILIANO et al., 2011)

Tabela 3 – Fatores que afetam o crescimento do *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina estafilocócicas em queijos.

Fatores	Tipo de queijo	Efeito no <i>S. aureus</i>	Efeito na produção de EEs	Referências
pH	Cheddar	Acidificação mais rápida resultou em uma melhor inibição no crescimento	EEA é mais comumente encontrada em culturas <i>starter</i> subnormais	Zehren e Zehren
Acidez Títulável (AT)			AT é um indicador melhor que pH para a produção da EEA em queijo	
Valor do pH durante as primeiras horas após fabricação	Semi-duro cru: • <i>Saint-Nectaire</i> • <i>Salers</i>	Rápido crescimento durante as primeiras 06 horas influenciam no crescimento entre 06 e 24h	EE detectada nos queijos <i>Salers</i> com valor de pH as 6h >6,5 e contagem de <i>S. aureus</i> > 5log UFC/g em um dia	Delbes et al.
Cultura inativada+ <i>roqueforti</i>	<i>starter Penicillium</i> Azul	Crescimento de 5.10 ⁷ UFC/g	Ausência de EEA (efeito do <i>Penicillium</i> ?)	Tatini et al.
Cultura inativada+ <i>aureus</i> /mL de leite pasteurizado	<i>starter S. aureus</i> 5-80 de leite Cheddar		EEA encontrada no queijo maturado a 11°C	Ibrahim et al.
(a) Inóculo da cultura <i>starter</i> : 0,5 ou 1% de sal: NaCl ou KCl/ NaCl 0, 1,2 ou 2.4% (b) Inóculo de <i>S. aureus</i> : 10 ³ UFC/mL de leite	Cheddar	Contagens baixas: com 1% na cultura <i>starter</i> e com KCl/NaCl	Níveis baixos em queijos com 08 semanas (0,05-0,52 ng/g) Sem relação entre a presença de EEA e do sal	Koenig e Marth
(a) Isolados de <i>S. aureus</i> : EEA, B, C ₁ , C ₂ ou D 10 ⁴ UFC/mL leite (b) Cultura <i>starter</i> : Anormal: 0,1%; Normal: 1%; (c) Maturação: 60 dias;	Manchego	Contagem da cinética de crescimento: 01log maior com cultura iniciadora anormal; População diminuiu durante a maturação.	EEA e EED: as únicas encontradas; Nível de EEA: cepa-dependente; Nível máximo: com cultura <i>stater</i> anormal; Variação da concentração de EE durante maturação	Gomez-Lucia et al.
Grande inóculo competitivo de <i>S. aureus</i>	Queijo suíço	Alta contagem de <i>S. aureus</i>	Produção de EEB	Todd et al.
Inóculo de <i>S. aureus</i> : (a) 10 ² a 10 ³ UFC/mL de leite (b) 10 ⁴ a 10 ⁶ UFC/mL de leite (c) Maturação: 41 dias;	Camembert (leite cru de cabra);	Contagens: 1,5log aumentou do leite para o coalho, depois estabilizou e aumentou durante maturação	EEA (a) Não encontrada; (b) 1 a 3,2 ng/g	Meyrand et al
Condições de processamento Tipo da cultura <i>starter</i> População inicial de <i>S. aureus</i>	Suíço Brick Mussarela Azul		EEA detectada nos queijos Suíço e Brick sob certas condições EEA não detectada no Mussarela ou no queijo Azul	Tatini et al.

(adaptada de Cretenet et al., 2011)

**CAPÍTULO II - Ocorrência de genes de enterotoxinas estafilocócicas em queijo de
coalho artesanal – Artigo**

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da revista Instituto Adolfo
Lutz e submetido para publicação.

Ocorrência de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em queijo de coalho artesanal

Occurrence of classical staphylococcal enterotoxin genes in artisanal coalho cheese

Amanda Chagas da SILVA*, Suely Cristina Pereira de Lima OLIVEIRA, Sérgio Santos de AZEVEDO, Vivianne Cambuí Figueiredo ROCHA, Marcia Almeida de MELO, Maria das Graças Xavier de CARVALHO.

*Endereço para correspondência: Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil. Telefone: (83) 3511-3000.

E-mail: amanda.chs@gmail.com

Recebido: Aceito para publicação:

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a presença de *Staphylococcus* spp. (Coagulase Positiva – SCP e Coagulase Negativa - SCN) enterotoxigênicos em queijo de coalho artesanal produzido na região do Sertão da Paraíba sendo coletadas 20 amostras durante o período chuvoso e seco. Contagem e identificação de SCP foram realizadas conforme o *Bacteriological Analytical Manual* da *Food and Drug Association* (FDA) e a pesquisa da presença dos genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR). No período chuvoso, as contagens de SCP variaram de $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/g enquanto no período seco, variaram de $1,0 \times 10^2$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/g. Quarenta colônias (29 SCP e 11 SCN) foram selecionadas sendo que três (7,5 %) apresentaram genes para as enterotoxinas. O gene *sec* foi encontrado em uma amostra SCP (período chuvoso) e os genes *sea* e *sed* foram encontrados em uma amostra SCP (período seco) e também em uma amostra SCN (mesmo período). Portanto, a pesquisa demonstrou que 80 % (16/20) das amostras de queijo de coalho artesanal foram considerados impróprios para consumo devido às altas contagens de SCP, além da presença de genes de enterotoxinas em SCP e SCN.

Palavras-chave: queijo artesanal; *Staphylococcus* coagulase positiva; PCR

ABSTRACT

In this study was evaluated the presence of *Staphylococcus* spp. (coagulase positive *Staphylococcus* - CPS and coagulase negative *Staphylococcus* - CNS) enterotoxigenic in artisanal coalho cheese produced in the Sertão region of Paraíba State; 20 samples were collected during the rainy and dry season. The CPS counting and identification were performed according to the Bacteriological Analytical Manual (FDA) and for the presence of the classical enterotoxins genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) by Polymerase Chain Reaction (PCR). In the rainy season, CPS counts ranged from $1,2 \times 10^4$ to $2,6 \times 10^5$ CFU/g and in the dry season ranged from $1,0 \times 10^2$ to $2,6 \times 10^5$ CFU/g. Forty colonies (CPS 29 and 11 CNS) were selected and three (7.5 %) had enterotoxin genes. The *sec* gene was found in a sample SCP (rainy season) and *sea* and *sed* genes were found in a SCP sample (dry season) and also in a SCN sample (same period). Therefore, the survey showed that 80% (16/20) of artisanal cheese curd samples were considered unfit for consumption due to high SCP counts and the presence of enterotoxin genes in SCP and SCN.

Keywords: Artisanal cheese; Coagulase Positive *Staphylococcus*; PCR

INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é muito popular e tradicional no Nordeste brasileiro, produzido geralmente de forma artesanal a fim de complementar a renda para os produtores de leite. Embora a legislação brasileira estabeleça que o leite utilizado na fabricação desse queijo seja pasteurizado, isso não é observado, não existindo uma padronização na sua fabricação. Devido ao não respeito das Boas Práticas de Fabricação (BPF), este produto pode ser veículo de bactérias patogênicas como os *Staphylococcus* spp. Elevadas contagens podem desencadear, na presença de cepas estafilocócicas enterotoxigênicas a produção de enterotoxinas, provocando surtos na população que o consome.^{1,2}

A incidência de SCP, principalmente *S. aureus* em queijo de coalho, é alta e foi relatada em vários estudos^{2,3,4}. Na maioria desses estudos, os queijos são classificados como impróprios para o consumo humano. A ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas foi constatada com frequência em produtos lácteos, especialmente em queijos, envolvidos ou não em surtos e casos esporádicos de intoxicação.^{2,4,5}

O gene *femA* é um marcador que tem sido estudado e explorado para a espécie *S. aureus*. Esse gene codifica uma proteína essencial precursora da biossíntese do peptidoglicano nessa espécie⁵. Vários estudos têm relacionado a amplificação do gene *femA* com a identificação fenotípica de *S. aureus*, o que permite diferenciá-la de outras espécies^{6,7}. Esse gene faz parte dos genes *fem* (*femX*, *femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE*), os quais codificam proteínas designadas de fatores essenciais para resistência a meticilina⁸.

São conhecidas mais de 20 diferentes tipos de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. O Comitê de Nomenclatura Internacional para Nomenclatura de Antígenos Estafilocócicos (*International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature* - INCSSN) recomendou que apenas os superantígenos estafilocócicos que induzem vômito após administração oral experimental em bioensaios podem ser designados como EE. Aqueles que não promovem êmese no modelo experimental designado ou não foram testados são denominadas *staphylococcal enterotoxin-like* (SEI). Desta forma as outras enterotoxinas são nomeadas SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ e SEIU, respectivamente. As enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) além de serem as mais envolvidas em surtos pelo mundo, apresentam a característica de provocar êmese em menos tempo e em quantidades menores em bioensaios com primatas. A técnica de PCR tem demonstrado ser um teste específico, sensível e rápido para caracterizar e auxiliar tanto na situação de surtos como também na identificação dos genes que codificam a produção de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp.^{9,10}

O objetivo deste trabalho foi isolar e quantificar a presença de SCP em amostras de queijo de coalho de produção artesanal e pesquisar a presença dos genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) em SCP e SCN utilizando a técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de queijo de coalho artesanal

Foram coletadas 20 amostras de queijo de coalho de 10 queijeiras artesanais na região do Sertão do Estado da Paraíba, Brasil, sendo 10 amostras coletadas durante o

período chuvoso e 10 amostras no período seco nas mesmas queijeiras. Os queijos eram fabricados com leite cru, ou seja, sem a pasteurização do mesmo, onde somente após o corte da coalhada, a massa passava por um “banho” de água aquecida a 80°C. Logo após a coleta, as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo seco para o Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Campina Grande para as análises microbiológicas.

Contagem e isolamento de *Staphylococcus* spp.

Das amostras de queijo de coalho foram retiradas 25g de forma asséptica e homogeneizadas em *stomacher* (Modelo 400; Seward, Inglaterra) com 225 mL de água peptonada a 1% (Himedia, Índia) com diluições adequadas inoculadas para contagem em ágar *Baird-Parker*; as placas invertidas foram incubadas a 35°C por 45-48h. O isolamento e a contagem das colônias de *Staphylococcus* foram realizados de acordo com a metodologia do *Bacteriological Analytical Manual* da FDA¹¹.

Para a contagem das colônias, somente as coagulase positiva foram utilizadas de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 12¹². Após a incubação, foram selecionadas placas da mesma diluição contendo entre 20 a 200 colônias típicas (colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca) e/ou atípicas (colônias cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos) de *Staphylococcus* spp.

Foram selecionadas três colônias dos dois tipos (típicas e/ou atípicas) que foram transferidas para ágar Infusão Cérebro Coração (Acumedia, EUA), incubadas a 37°C por 24 h e posterior realização da identificação por teste de coloração de Gram e catalase e outros como a coagulase, produção de termonuclease em ágar Azul de Toluidina, utilização anaeróbica de glicose e manitol e sensibilidade à furazolidona^{11,13}.

Para a comparação dos períodos chuvoso e seco quanto à contagem de *Staphylococcus* spp, os dados foram transformados em logaritmo de base 10 e então efetuado o teste t de *Student*. O nível de significância adotado foi de 5 %, e o programa estatístico utilizado foi o BioEstat 5.03.

Deteção dos genes de enterotoxinas clássicas

Foram selecionadas 40 cepas aleatoriamente, duas colônias de cada amostra de queijo, (29 SCP e 11 SCN) compreendendo cepas dos dois períodos da coleta (chuvoso e seco).

Para o isolamento e extração do DNA bacteriano, as cepas selecionadas foram incubadas por 18 horas em caldo de Infusão Cérebro Coração (Himedia, Índia) a 35°C. Após centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido, mantendo os *pellets* no fundo dos *ependorfs*. Para a extração do DNA, foi utilizado o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Brasil) seguindo-se a recomendação do fabricante.

Para a pesquisa e detecção dos genes produtores das enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) e o gene *femA* foi utilizado o PCR Uniplex nas colônias isoladas; foram utilizadas cepas controles *S. aureus* ATCC 13565 para o gene *sea*, ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1. As referências da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes das enterotoxinas clássicas estão citadas no trabalho de Rosec e Gigaud¹⁴. Para o gene *femA*, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Mehrotra et al⁷.

A metodologia adotada para o PCR foi de acordo com o trabalho de Arcuri et al.¹⁵ com algumas modificações, foi utilizado o PCR Uniplex e a extração do DNA (antes diluído em 50 µL de solução tampão TE - Tris-EDTA), seguiu-se a recomendação do fabricante do Brazol. A solução de reação foi composta por 10 X de tampão PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 10 µM de dNTP, 1,0 µM de cada oligonucleotídeo, 2 U da enzima Taq DNA polimerase e 5 µL do DNA bacteriano completando com 7,8 µL de água ultrapura para um volume final de 20 µL. Para o controle negativo, era utilizada uma reação sem DNA bacteriano, completando com água a mistura. A amplificação dos genes foi realizada em termociclador (Biocycler, EUA) com um ciclo inicial a 95 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e um ciclo final a 72 °C por cinco minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,2 % corado com Gel Loading Dye Blue (Thermo Scientific, EUA), e fotografados em transiluminador com luz ultravioleta.

RESULTADOS

Contagem e isolamento de *Staphylococcus* em queijo de coalho

Foram analisadas 20 amostras de queijo de coalho para a contagem de SCP. As contagens das amostras variaram de $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/g no período chuvoso e de $1,0 \times 10^2$ a $2,6 \times 10^5$ no período seco. Os valores da contagem de todas as amostras estão descritos na Tabela 2. No período chuvoso, todas as amostras apresentaram resultados fora do limite máximo para contagem de SCP segundo a RDC número 12 da ANVISA⁸ que exige um valor máximo de 10^3 UFC/g de queijo. Já no período seco, somente 40 % (04/10) das amostras ficaram dentro do preconizado pela legislação. Comparando as médias das contagens de SCP, no período chuvoso o valor foi de $1,5 \times 10^5$ e no período seco foi de $9,4 \times 10^4$, houve diferença estatística ($p = 0,037$) entre os períodos, ou seja, a média de contagem foi maior no período chuvoso.

Para as análises complementares, 118 cepas de *Staphylococcus* spp. foram isoladas, sendo 72 SCP e 46 SCN.

Detecção dos genes das enterotoxinas clássicas

Para o gene *femA*, característico do gênero *Staphylococcus* e geralmente utilizado para identificar a espécie *S. aureus*, em uma amostra este não foi encontrado embora no resultado dos testes para identificação a amostra estava sendo caracterizada como SCP.

Do total das 40 colônias selecionadas, através do PCR, três (7,5 %) amostras apresentaram pelo menos um gene para as enterotoxinas clássicas.

O gene *sec* foi encontrado em uma amostra SCP do período chuvoso e os genes *sea* e *sed* foram encontrados em uma amostra SCP no período seco e uma amostra SCN do mesmo período. Os outros genes para as toxinas clássicas não foram encontrados.

DISCUSSÃO

De todas as amostras de queijo de coalho artesanal (período chuvoso e seco), 80 % (16/20) das amostras apresentaram contagens de SCP acima do limite máximo permitido (10^3 UFC/g) segundo a RDC número 12 da ANVISA⁸. Somente no período

seco 40 % (04/10) das amostras apresentaram contagens dentro do preconizado pela legislação. Contagens elevadas (acima de 10^5 UFC/g) e sob condições adequadas como temperatura, pH, atividade de água e oxigenação são suficientes para produção de toxinas como descrito por Jablonski e Bohach¹⁶.

Freitas et al.⁴ encontraram em queijo de coalho no Pernambuco valores de 10^2 a 10^6 UFC/g nas contagens de SCP das 10 amostras analisadas, valores mais próximos dos descritos neste presente estudo. Em estudos realizados com queijo de coalho artesanal no Rio Grande do Norte, Feitosa et al.² ao analisar a qualidade microbiológica geral destes produzido em microrregiões deste Estado, observaram a ocorrência de SCP em 72,7 % das amostras, com contagens altas como neste estudo, variando entre $7,0 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/g classificando o produto em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Andrade³ trabalhando com queijos de coalho artesanais e industriais no Ceará, encontrou no produto artesanal valores variando entre $1,3 \times 10^6$ UFC/g e $6,6 \times 10^9$ UFC/g e $1,3 \times 10^7$ UFC/g a $2,9 \times 10^{10}$ no queijo industrial, contagens muito mais altas que as registradas neste estudo para o queijo artesanal.

Altas contagens de SCP (principalmente *S. aureus*) são frequentemente reportadas em queijos de coalho artesanais. Por se tratarem de queijeiras geralmente sem inspeção e também sem o atendimento às BPF desde a recepção do leite até o produto final, poderia explicar contagens tão altas de SCP. Em relação às BPF, a maioria dos manipuladores, na realidade do Sertão da Paraíba, nunca tiveram a oportunidade de participar de um treinamento sobre a produção higiênica de queijos onde que em sua maioria, receberam uma educação informal, esta entendida aqui como um processo de difusão de conhecimentos e técnicas inerentes à agricultura, geralmente familiar.

Além do leite, outras formas de contaminação dos queijos podem ser o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru, a principal fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual SCP (geralmente *S. aureus*) é o principal agente etiológico. Como os *Staphylococcus* podem ser encontrados nas fossas nasais, garganta e pele de portadores humanos, estudos epidemiológicos de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica sugerem os manipuladores como a principal fonte de contaminação de alimentos.

Deve-se considerar também a forma de armazenamento durante a comercialização, principalmente dos queijos de coalho artesanais que são expostos a temperaturas inadequadas (temperatura ambiente) e são armazenados sob refrigeração somente no final do dia ¹⁷. De acordo com a Instrução Normativa nº 30, o queijo de coalho deve ser armazenado a uma temperatura não superior a 12 °C durante sua conservação e comercialização¹⁸.

A alta contagem de SCP nos queijos durante o período chuvoso poderia ser explicado devido a uma provável fonte de contaminação pelo leite cru de vacas com mastite. Como descrito na literatura, em períodos com maiores ocorrências de chuvas, as condições higiênicas do rebanho ficam comprometidas pela influência negativa da elevação dos níveis de umidade que, em conjunto com a temperatura, favorecem a sobrevivência e a proliferação dos *Staphylococcus*. Observa-se que quanto mais chuvoso for o período, maior é o número de novas infecções intramamárias por bactérias do gênero *Staphylococcus*, principalmente por *S. aureus*^{19,20}.

Para o gene *femA*, geralmente utilizado para identificar a espécie *S. aureus*, em uma amostra este não foi encontrado embora no resultado dos testes de isolamento pela FDA a amostra estava sendo caracterizada como SCP. O teste de sensibilidade à furazolidona é utilizado para separar isolados do gênero *Micrococcus* sp. dos *Staphylococcus* sp. e esta amostra apresentou sensibilidade no teste. Como o *femA* é um marcador essencial e específico para a identificação genética da espécie *S. aureus* e também um importante gene auxiliar na expressão gênica dos precursores para a produção da resistência à metilina, este gene não é uma região somente conservada nessa espécie, outras pesquisas relatam que a presença deste gene em algumas espécies SCP e SCN²¹.

Assim como observado no nosso estudo, tanto as cepas SCP e SCN ampliaram o gene *femA*, demonstrando assim que este gene é uma região conservada no gênero *Staphylococcus*. Resultado semelhante foi encontrado por Andrade³, onde foi observado nas amostras de queijo de coalho artesanal, de 40 isolados de *S. aureus* pela identificação pelo método API Staphy ®, nas análises moleculares específico para o gene *femA*, este foi encontrado em 95% (38/40) das cepas avaliadas. Nas amostras SCN, a presença deste gene também foi observada em 16,4 % (9/55) das cepas isoladas de queijo de coalho artesanais.

Alborn et al. ²² pesquisando um fragmento de DNA que foi identificado e clonado a partir de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) usando o fragmento do *femA* e do *femB* de *S. aureus*. A análise da sequência de DNA de uma porção deste clone revelou duas *Open Reading Frame* (ORFs - “fase de leitura aberta” entendida aqui como a cada uma das sequências de DNA compreendidas entre um codão de início da tradução e um codão de terminação) completas altamente relacionadas com *femA/femB* do *S. aureus*. O arranjo genômico do complexo *S. epidermidis/femA-femB* foi quase idêntico ao observado no *S. aureus*, ou seja, há um parentesco intra e inter-espécies destes genes e conservação da organização genômica consistentes desses genes num organismo ancestral. O *femA* ocorre em todas as estirpes de *S. aureus* assim como também ocorrem em todos os ECN examinados até agora

O que pode ter acontecido na única amostra que não ampliou o gene *femA* é que o oligonucleotídeo utilizado apresentou uma variabilidade na região genômica analisada. Um trabalho realizado na Índia com amostras clínicas de *S. aureus* mostrou resultados intrigantes onde o gene *femA* não foi amplificado em 70,4% dos isolados, mesmo sendo utilizado com pares diferentes de oligonucleotídeos, o que poderia indicar também uma variação de anelamento deste gene. Variabilidade (polimorfismo) em sequências genéticas não são incomuns em *S. aureus*. Até mesmo marcadores da espécie altamente conservados como os genes da Coagulase (*coa*) e da proteína A (*spa*) têm demonstrado polimorfismo ²³. Entretanto, o resultado das outras 39 amostras que amplificaram o *femA* apontam que este pode ser utilizado como um marcador para o gênero *Staphylococcus*, pois as amostras era tanto SCP quanto SCN.

O gene *sec* foi encontrado em uma amostra SCP do período chuvoso. Freitas et al.⁴, trabalhando também com queijo de coalho, encontrou o gene *sec* presente em 11% (20 no total) de todas as cepas isoladas (*S. aureus*, SCP e SCN). Estes autores trabalharam também com genes de enterotoxinas não clássicas, sendo encontrado uma variabilidade maior na distribuição destes genes nas cepas pesquisadas.

Já uma amostra SCP e outra amostra SCN apresentaram ambos os genes *sea* e *sed*, no período seco.

A toxina A é mais comumente relacionada a surtos, juntamente com a presença do gene *sea*. Kérouanton et al. ²⁴ pesquisando cepas de *S. aureus* de alimentos envolvidos em surtos na França, das 33 cepas isoladas, o gene *sea* foi o mais presente,

em 23 cepas. Também foi observado este mesmo gene em combinação com *sed* (12) ou com *seh* (cinco). Os autores concluíram que o gene *sea* é dominante e geralmente associado ao *sed* ou ao *seh* em cepas de *S. aureus* relacionadas com surtos ocorridos no país. Através da genotipificação destas cepas por Eletroforese em Campo Pulsante (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), o biótipo de origem humana foi observado em 26/31 (83.9 %) e de origem ovina ou Hospedeiro Não Específico (HNE) nas cepas restantes. Biótipos humanos são esperados em surtos; nas amostras de queijos feitos com leite cru, biótipos não humanos são mais frequentemente encontrados.²⁴

Segundo Genigeorgis²⁵, cepas isoladas de humanos geralmente produzem SEA já cepas oriundas de animais como a vaca produzem SEC ou SED, e de ovinos, SEC.

É estimado que de 20 a 50% da população possuem *S. aureus* nas fossas nasais, sendo estas na maioria enterotoxigênicas. É comum em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica a contaminação do alimento através do manipulador devido às infecções estafilocócicas não tratadas. Se a infecção é identificada, o tratamento deve ser iniciado e o manipulador afastado da produção até a sua melhora^{26,27}.

No Japão, em um surto com amostras de leite reconstituído e leite em pó desnatado, foi detectada uma pequena quantidade de enterotoxina A e a presença do gene *sea*, os genes *sea* e *seh* foram detectados em 10 amostras do leite envolvido neste surto²⁸. E na Coreia do Sul, Cha²⁹ pesquisando isolados de *S. aureus* em surtos em alimentos, encontrou o gene *sea* mais dominante e mais frequentemente associado com *seh* ou *seg-sei*.

Veras et al.⁵ trabalhando com amostras de queijo minas artesanal envolvidas em surtos em Minas Gerais, de todas as 30 amostras selecionadas (15 SCP e 15 SCN), 38 % amplificaram somente o *sea* e 24 % amplificaram *sea* e *seb*.

O gene *sed* foi observado em apenas uma amostra, sendo esta SCN. Rall et al.³⁰ trabalhando com 57 cepas de *S. aureus* em leite cru, encontrou genes para enterotoxinas em 39 (68.4 %) amostras, os genes mais frequentes foram o *sea* em 16 cepas (41 %), *sec* (20,5 %) em 8 cepas, *sed* (12,8 %) em 5 cepas, *seb* (7,7 %) em 03 cepas e *see* (5,1 %) em 02 cepas. Apesar da grande discrepância entre a prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos na literatura, muito é atribuído aos diferentes tipos de alimentos envolvidos, a EEA é a enterotoxina mais observada em cepas de *S. aureus*

enterotoxigênicos. Entretanto, os SCN também possuem os genes para as enterotoxinas como descrito nos trabalhos de Rall³⁰ e no nosso trabalho, devendo assim dar importância e mais atenção aos SCN quando que possam vir a expressar estes genes em condições favoráveis, principalmente envolvendo derivados do leite, como o queijo.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que grande parte do queijo de coalho artesanal produzido (80 %) foi considerado inapropriado para o consumo devido às altas contagens de SCP, o que se encontra em nível que podem permitir a produção de enterotoxinas estafilocócicas. A presença de genes das enterotoxinas (*sea*, *sec* e *sed*) reforçam ainda mais essa preocupação, pois o queijo de coalho é um meio propício para a proliferação de SE, onde estes podem vir a produzir toxinas causando surtos na população que venha a consumir este alimento. Tais resultados refletem diretamente à falta de atenção nas medidas de higiene, a possíveis falhas nos procedimentos de limpeza e desinfecção das linhas de produção, o controle da matéria-prima, a atenção para o processamento térmico para a produção destes alimentos, o não respeito das temperaturas praticada durante o transporte e o armazenamento do queijo de coalho que influenciam nos níveis de contaminação.

Medidas sanitárias, como a implementação através de treinamentos das BPF e a aplicação da Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle durante a produção e comercialização destes produtos, juntamente com o treinamento dos manipuladores de queijo, são de suma importância juntamente com uma vigilância mais atuante.

REFERÊNCIAS

1. Escobar CAM, Leuthier S, Antunes, G.; Albuquerque RCL et al. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. *Revi. Inst. Latic.* Cândido Tostes, 2001, 56(321): 248-256.
2. Feitosa T, Borges M F, Nassu, RT, Azevedo EHF, Muniz, CR. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc. e Tecn. Alimentos*, 2003, 23:

162-165.

3. Andrade APC. Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de coalho [dissertação de mestrado]. Fortaleza-CE: Universidade Federal do Ceará, 2009.
4. Freitas MFL, Luz IS, Pinheiro Júnior JW, Duarte DAM, Vasconcelos AMM, Ribeiro AR, Mota RA et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. Ciênc. Tecn. Alimentos, 29(2); 365-379, 2009.
5. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, dos Santos DA, et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int J Infect Dis. 2008;12:410-5.
6. Borges MF, Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência [tese de doutorado]. Campinas-SP, 2006.
7. Mehrotra M, Wang G, Johnson, WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 2000, 38(03): 1032-1035.
8. Benson TE, Prince DB, Mutchler VT, Curry KA, Ho AM, Sarver RW, Hagadorn JC, Choi GH, Garlick RL. X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus* femA. Structure. 2002, 10 (08): 1107-1115.
9. Hennekinne JA, Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36:815-836.
10. Omoe K., Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in

Staphylococcus aureus isolates. FEMS Microb Letters. 2005, 246 (02): 191-198.

11. Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. In: Food Drug Administration (Ed.). Bacteriological analytical manual online. 8rd ed. Gaithersburg: AOAC International, Acesso em: 25 de Março de 2014. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>]
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.
13. Baker, John S. Comparison of Various Methods for Differentiation of *Staphylococci* and *Micrococci*. J Clin Microbiol., 1984; 19(06): 875-879.
14. Rosec, J. P.; Gigaud, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. Int J Food Microbiol, 2002, 77 (1/2): 61-70.
15. Arcuri EF, Ângelo FF, Guimarães MFM, Talon R, Borges MF, Leroy S, et al. Toxigenic Status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and minas frescal cheese in brazil. J Food Prot. 2010, 73(12): 2225-2231.
16. Jablonski, L. M. ; Bohach, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. Food Microbiology, fundamentals and frontiers. 2ª ed. Washington: ASM, 2001.
17. Assumpção EG, Piccoli-Valle RH, Hirsch D, Abreu LR. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. Arq Bras Med Vet Zootec. 2003, 55(03): 366-370.
18. Brasil. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e

Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 de julho de 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

19. Zafalon LF, Langoni H, Benvenuto F, Castelani L, Broccolo CR. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. Vet Zootec. 2008;15(1):56-65.
20. Picoli T, Zani JL, Ponzilacqua B, Ribeiro MER, Fischer G. Taxa de novas infecções intramamárias em vacas leiteiras, ligadas à precipitação pluviométrica. Science and Animal Health. 2013, 1(1): 11-23.
21. Vannuffel P, Heusterspreute M, Bouyer M, Vandercam B, Philippe M, Gala JL. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. Res Microbiol. 1999;150:129-41.
22. Alborn WE, Hoskins J, Unal S, Flokowitsch JE, Hayes CA, Dotzlar JE, Yeh WK, Skatrud PL, Cloning and characterization of *femA* and *femB* from *Staphylococcus epidermidis*, Gene. 1996, 180:177–181.
23. Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. Int J Food Microbiol. 2007, 115: 369-375.
24. Genigeorgis CA. Present state of knowledge on staphylococcal intoxications. Int. J. Food Microbiol. 1989, 9 (4): 327-360.
25. Gustafson JE, Muthaiyan A, Dupre JM, Ricke SC. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review, Food Control. Acesso em: 14 de Outubro de 2014. Disponível em: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514005982>].

26. Murray, R. J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin mediated disease. *Int Med J.* 2005, 35, 106-119.
27. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K et al. 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. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130: 33-40.
28. Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101: 864–871.
29. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis, RL, Fernandes Jr. A, Candeias JMG et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol.* 2008; 132:408-413.
30. Chikkala, R, George, NO, Ratnakar, Kamaraju S.; Iyer, Ranganathan Natarajan; Sritharan, Venkataraman. Heterogeneity in *femA* in the India isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. *Adv. Infect. Dis.* 2012; 2: 82-88.

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a amplificação dos genes que codificam as enterotoxinas em *Staphylococcus*.

Oligonucleotídeos (5'– 3')	Gene alvo	Produto Amplificado
SEA1: ACGATCAATTTTACAGC	<i>sea</i>	544 bp
SEA2: TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC		
SEB1: GAATGATATTAATTCGCATC	<i>seb</i>	416 bp
SEB2: TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC		
SEC1: GACATAAAAGCTAGGAATT	<i>sec</i>	257 bp
SEC2: AAATCGGATTAACATTATCCA		
SED1: TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT	<i>sed</i>	334 bp
SED2: CCACCATAACAATTAATGC		
SEE1: ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA	<i>see</i>	170 bp
SEE2: TAACTTACCGTGGACCC		
FEMA1: AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	<i>femA</i>	132 bp
FEMA2: GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG		

Tabela 2 – Resultado das contagens de *Staphylococcus* Coagulase Positiva das amostras de queijo de coalho artesanal coletados durante o período chuvoso e seco no Sertão do Estado da Paraíba em 2014.

Período	Queijeira	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva UFC/g
Chuvoso	A	$5,0 \times 10^4$
	B	$6,5 \times 10^4$
	C	$6,1 \times 10^5$
	D	$5,5 \times 10^4$
	E	$8,0 \times 10^4$
	F	$8,1 \times 10^4$
	G	$1,2 \times 10^4$
	H	$2,1 \times 10^5$
	I	$3,1 \times 10^4$
	J	$2,6 \times 10^5$
Seco	A	$2,6 \times 10^5$
	B	$2,0 \times 10^2$
	C	$1,2 \times 10^4$
	D	$1,4 \times 10^3$
	E	$9,5 \times 10^2$
	F	$3,6 \times 10^5$
	G	$5,5 \times 10^4$
	H	$1,8 \times 10^5$
	I	$7,0 \times 10^4$
	J	$1,0 \times 10^2$

CONCLUSÃO GERAL

Segundo a literatura consultada, os surtos por intoxicação alimentar causados por SE ainda é muito frequente, sendo o *S. aureus* o mais relatado. As principais intoxicações alimentar estafilocócicas ocorrem com queijos artesanais, apontando deficiências na fabricação desses queijos, geralmente com leite cru, favorecendo a proliferação dos SE que em grande densidade, podem produzir as EEs. Mais estudos sobre a relação entre os SE e as características microbiológicas e físico-químicas de queijos devem ser feitos, de forma a assim, haver um melhor entendimento da influência desses fatores sobre a produção das EEs.

Na pesquisa de genes de enterotoxinas clássicas em queijo de coalho da região do Sertão, verificou-se a presença de genes em três amostras (*sea*, *sec* e *sed*) tanto em cepas SCP quanto SCN, trazendo dessa forma informação valiosa sobre a presença de cepas enterotoxigênicas durante o fabrico do queijo artesanal. Mais pesquisas sobre o biótipo dessas cepas (origem animal ou humana) e associar juntamente com o resultado da presença de genes, a capacidade dos SE produzirem enterotoxinas são necessárias, auxiliando assim na identificação etiológica.

Sendo essencial também, juntamente com a parte da pesquisa, o treinamento dos manipuladores de queijo de coalho e a aplicação das BPF nas queijeiras.

ANEXOS

ANEXO 1 - Instruções para publicação na Revista Ciência Rural



ISSN Impresso: 0103-8478

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que **ser obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR. **As despesas de tradução serão por conta dos autores**. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

3. O artigo científico (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. Alternativamente

pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

10.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

10.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

10.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

10.4. Artigo completo:
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

10.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

10.6. Tese, dissertação:
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f.

Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

10.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

10.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

10.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

12. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).
16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente.
20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”

ANEXO 2 - Instruções para publicação na Revista Instituto Adolfo Lutz



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ISSN 0073-9855 *versão
impressa*
ISSN 1983-3814 *versão on-
line*

- Escopo e política
- Forma e preparação dos manuscritos
- Envio de manuscritos

Escopo e política

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS) – bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

Forma e preparação de manuscritos

Informações Gerais

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a

seguir.

1. Categoria de artigos

1.1 Artigos Originais: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Informações complementares:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- Tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 Artigos de Revisão: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a

inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*key words*).

1.3 Comunicações Breves: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- Tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 Notas Científicas: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- Tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e

outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 Relatos de Caso: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- Tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 Resumos de Teses e Dissertações: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. Apresentação do manuscrito: Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word for Windows 2003* ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A

estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 Página de Identificação: Deve constar:

· **Título em português e em inglês:** O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

· **Autores:** De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

· **Afiliação:** Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

· **Financiamento da pesquisa:** Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

· **Apresentação prévia:** Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 Preparo do manuscrito:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/key words: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo,

extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

· **Introdução:** Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

· **Material e Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

· **Resultados:** Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

· **Discussão:** A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

· **Agradecimentos:** Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes

de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 Citação no texto: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de **expoente**, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 Referências: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação

nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. J Am Oil Chem Soc. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. Cad Saude Coletiva [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001[acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Genebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não

como *quadros, gráficos etc.*

· **Tabelas:** Devem ser apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

· **Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. Declarações e documentos solicitados: Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade		
	Autor responsável	Aprovação
pelos Agradecimentos		
Transferência de		
	Todos	Aprovação
Direitos Autorais		

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

· Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE

(<http://www.icjme.org>).

- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL .

4. Verificação dos itens exigidos na submissão:

- Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
- Título do manuscrito, em português e inglês.
- Texto apresentado em letras *Times New Roman*, corpo 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
- Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
- Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
- Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
- No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
- Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
- Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas.
- Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. Revisão da redação científica: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. Provas: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à

redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (*portable document format*). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. Publicação e distribuição: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

Envio de manuscritos

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)
Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP:
01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br