PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS
DE *Staphylococcus aureus* ROSENBACH, 1884, ISOLADAS DE
FOSSAS NASAIS E DE ALGUMAS AMOSTRAS CLÍNICAS

PAULO CESAR VERTONI
Biomédico

Orientador: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Con-
centração: Microbiologia Agríco-
la.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1989

V 568p Vertoni, Paulo César
Produção de enterotoxinas por linhagens de *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884, isoladas de fossas nasais e de algumas amostras clínicas.
Piracicaba, 1989
70p., illus.
Diss. (Mestre) ESALQ
Bibliografia.
1. Alimento - Bacteriologia 2. Bactéria patogênica - Toxina - Produção 3. Intoxicação alimentar I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 589.95

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ROSENBACH, 1884, ISOLADAS DE FOSSAS NASAIS E DE ALGUMAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Paulo César Vertoni

Aprovada em: 02/06/1989

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Pedro Bertolini

FOP/UNICAMP

Profª Drª Rahme Nelly Neder

ESALQ/USP

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo
Orientador

A minha esposa

VANGRI

Aos meus filhos

CIBELE, CRISTIANE, JOÃO e PAULA

OFEREÇO.

Aos meus pais

JOÃO, MARIA, FREDERICO e MARY

Aos meus avós

DONATO e VITÓRIA

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece àqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, com destaque para:

- Professor e Orientador Dr. Rodolpho de Camargo, pelo apoio e orientação prestada no decorrer do trabalho e elaboração desta dissertação e, fundamentalmente, pelo seu espírito de coleguismo e cordialidade para com seu orientado.

- Professor Dr. Merlin Scott Bergdoll, pelo fornecimento de materiais imprescindíveis, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, além do apoio na orientação indireta e disposição com que se propôs a auxiliar, embora distante.

- Professor Dr. Frederico Pimentel Gomes pela sua amizade e espírito de colaboração que muito contribuiu para a redação final desta dissertação.

- Professores do Curso de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos, pela colaboração e, principalmente pela amizade fraterna para com seu aluno e amigo.

- Técnicos do Setor de Microbiologia, Biblioteca e Desenho do Departamento de Tecnologia Rural, pela ajuda prestada e principalmente pela amizade.

- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio concedido.

- Ao Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ-USP, pelo uso das suas instalações.

- Ao Centro de Patologia Clínica Preventiva PREV-LAB, Piracicaba, pelo fornecimento dos isolados clínicos.

- A Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, pelo fornecimento das culturas controle.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1. Considerações gerais sobre <i>S. aureus</i>	08
2.2. A intoxicação alimentar estafilocócica ...	13
2.3. As enterotoxinas estafilocócicas	15
2.4. Estudos de <i>S. aureus</i> e enterotoxinas no Bra sil	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Materiais para isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	28
3.1.1. Amostras	28
3.1.2. Meios de cultura	28
3.1.3. Corantes	29
3.1.4. Soluções e reagentes	29
3.1.5. Outros materiais	29
3.2. Material para produção de enterotoxinas es tafilocócicas	29
3.2.1. Amostras	29
3.2.2. Meios de cultura	30
3.2.3. Solução	30
3.2.4. Outros materiais	30
3.3. Material para caracterização de enterotoxi nas estafilocócicas	31
3.3.1. Amostras	31
3.3.2. Meios de cultura	31

3.3.3. Soluções e reagentes	32
3.3.4. Outros materiais	32
3.4. Métodos de isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	32
3.4.1. Isolamento de diferentes portadores eventuais	32
3.4.2. Prova da coagulase	33
3.4.3. Prova de termonuclease	34
3.4.4. Prova do "Staphy-Test" PROBAC do Brasil	35
3.5. Método para produção de enterotoxinas estafilocócicas	36
3.5.1. Método "Sac-culture"	36
3.6. Método para detecção das enterotoxinas	38
4. RESULTADOS	42
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	66

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ROSENBACH, 1884, ISOLADAS DE FOSSAS NASAIS E DE ALGUMAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Autor: Paulo Cesar Vertoni

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

RESUMO

Este trabalho teve em mira estudar, com dados locais, a ocorrência de linhagens de *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 produtores de enterotoxinas. Para isso, obtiveram-se amostras de fossa nasal de 122 pessoas da cidade de Piracicaba (SP), no ano de 1988. Destas amostras foram isoladas 34 culturas de *S. aureus*. Trabalhou-se também com 30 culturas clínicas cedidas pelo laboratório do Prev - Lab (Centro de Patologia Clínica Preventiva) de Piracicaba e ainda com 3 culturas cedidas pela Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, de Campinas, SP, estas sabidamente produtoras de enterotoxinas dos tipos A, B e D. A identificação foi feita pelos métodos seguintes: microscopia com coloração de Gram, prova de coagulase, prova de termonuclease e "Staphy-Test". Realizou-se a seguir prova de produção de enterotoxina, que, posteriormente também foi identificada pelo "Optimum Sensitivity Plate".

Das 30 amostras clínicas, 16 se revelaram pro

dutoras de enterotoxina, sendo 4 do tipo A, 8 do tipo B, 3 dos tipos A e B simultaneamente, e uma do tipo C₃, além de 14 que não produziram enterotoxina desses tipos. Dos 34 isolados de amostras de fossa nasal, 5 foram produtoras de enterotoxina de tipo A e uma do tipo D. À vista deste resultado, o autor salienta a necessidade de medidas sanitárias adequadas para impedir a contaminação de alimentos por pessoas portadoras de *S. aureus* com capacidade de causar surtos de intoxicação alimentar.

PRODUCTION OF ENTEROTOXINS BY STRAINS OF *Staphylococcus aureus* ROSENBACH, 1884, OBTAINED FROM ANTERIOR NARES AND OF SOME CLINICAL SAMPLES

Author: Paulo Cesar Vertoni

Adviser: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

SUMMARY

This dissertation had the aim of studying, with local data, the occurrence of strains of *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 producing enterotoxins. Samples of the anterior nares of 122 persons from the city of Piracicaba, State of S. Paulo, Brazil, were collected. From these samples 34 cultures of *S. aureus* were isolated. The author studied also 30 clinical cultures furnished by the Prev-Lab ("Centro de Patologia Clínica Preventiva") laboratory, from Piracicaba, and further with 3 cultures received from the "Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello", from Campinas, State of São Paulo, Brazil, these known to produce enterotoxins of the types A, B and D. The identification of organisms was carried out by the following methods: microscopy with Gram staining, coagulase test, thermonuclease test and "Staphy-Test". Afterwards a test of production of enterotoxin was carried out, which was identified by the "Optimum Sensitivity Plate".

Among the 30 clinical samples, 16 produced

enterotoxin, being 4 of type A, 8 of type B, 3 of types A and B simultaneously, and one of type C₃, besides 14 which did not produce enterotoxins of these types. Among the 34 strains originated from samples of anterior nares, 5 produced enterotoxins of type A, and one of type D. Having in view these results, the author recommends that suitable sanitary measures should be taken to avoid the contamination of food by carriers of *S. aureus* capable of giving origin to outbreaks of food poisoning.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos têm uma participação bem conhecida, na epidemiologia de doenças transmissíveis, onde agentes patogênicos de origem humana ou animal desempenham um papel importantíssimo na cadeia do processo toxi - infeccioso. Através desses produtos várias bactérias, como *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *Bacillus cereus* gastroenteritis, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* spp., *Arizona hinshawii*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *Campylobacter* spp. e *Shigella* spp. e outras (REIMANN, 1972; ICMSF, 1978; FRAZIER & WESTHOFF, 1978; SPECK, 1984) podem ser veiculadas.

Alguns desses agentes quando presentes em alimentos em certo número, podem ocasionar "envenenamento alimentar", termo este aplicado para definir doenças causadas por microrganismos, que podem ser uma infecção ou intoxicação alimentar (FRAZIER & WESTHOFF, 1978), sem que tenha havido necessariamente multiplicação prévia.

Deve ser salientada, ainda, a possibilida-

de de que outros microrganismos, além das bactérias, podem causar várias doenças como resultado da ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, que são produtos metabólicos de fungos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Streptomyces* spp., *Claviceps purpurea*, *Gliocladium fimbriatum*, *Gymnoascus* spp., *Trichophyton* spp., *Giberella zeae*, *Cladosporium* spp., *Mucor* spp.; com certos vírus como poliovírus, adenovírus, vírus coxsackie, vírus da hepatite infecciosa; por riquetsias e clamídeas; vários protozoários como *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* e *Giardia lamblia*; e ainda algumas algas como *Gomyaulax catenella*, *G. tamareusis* e *Lyngbya majuscula* (KLAPAN et alii, 1962; CLIVER, 1969; REIMANN, 1972; ICMSF, 1978; FRAZIER & WESTHOFF, 1978; PELCZAR et alii, 1981; SPECK, 1984).

Certos microrganismos patogênicos, quando atingem os alimentos, podem aí encontrar bons meios de cultura, o que favorecerá a sua multiplicação e, dependendo do seu grau de patogenicidade, podem determinar quadros clínicos de toxinfecções alimentares (THATCHER & CLARK, 1973 e FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

As toxinfecções alimentares com exceção do botulismo, onde uma neurotoxina é produzida, são distúrbios do trato gastro-intestinal com dores abdominais e diarreia, e comumente com vômitos, sintomas que aparecem entre 2 (duas) a 48 horas após a ingestão do alimento contaminado (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

Entre as bactérias responsáveis por surtos de intoxicação destaca-se o microrganismo *S. aureus*. São cocos Gram positivos, medindo de 0,8-1,0 μ de diâmetro, dispostos como um aglomerado de esferas ou pequenas cadeias de três ou duas células, ou ainda uma única célula, quando observado microscopicamente, e que tendem a ser ligeiramente menores quando de linhagens patogênicas; imóveis e anasporógenos; aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, crescem bem em vários meios de cultura, usualmente sem cápsula; catalase, coagula-se, termonuclease e "Staphy-Test" positivas, e pertencentes à família *Micrococaceae*, onde ocupam posição relevante como agente etiológico (REIMANN, 1972; KLOOS & SMITH, 1980; KLOOS & SCHLEIFER, 1986 e FRANCO & NIELSEN, 1988).

Segundo REIMANN (1972), nos Estados Unidos da América, ao lado do *Clostridium perfringens*, o *S. aureus*, é o principal agente de surtos, sendo que em outros países, como Inglaterra e Japão, também ocupa uma posição de destaque, embora não seja o principal microrganismo patogênico responsável por esses problemas.

Um aspecto complexo associado com a intoxicação estafilocócica é o crescimento do microrganismo em muitos alimentos sem que produza odor ou sabor pronunciado. Um alimento com alguns milhões de estafilococos por grama pode ter gosto, odor e aparência pouco diferentes de outro onde não tenha ocorrido proliferação deste microrganismo. Portanto, esse alimento contaminado pode ser inge

rido sem que seja percebida qualquer alteração significativa que impeça o seu uso.

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é devida a uma proteína secretada, solúvel em água, de baixo peso molecular (26.000 a 35.000) constituída somente de aminoácidos e de elevada resistência térmica (REIMANN, 1972; FRAZIER & WESTHOFF, 1978). Esta proteína é conhecida como enterotoxina estafilocócica. Segundo DELEZARI & LEITÃO (1976), vários pesquisadores confirmaram em seus estudos que existe mais de um tipo de enterotoxina e, através de técnicas de reação por precipitação com anticorpos específicos, puderam classificá-la em: A, B, C, D e E.

De acordo com BERGDOLL (1988) sete tipos de enterotoxinas são conhecidos atualmente com base em reações com anticorpos específicos, tipo A, B, C₁, C₂, C₃, D e E.

Como sintomas da doença, ocorrem náusea, diarréia, vômito, dor de cabeça, dores abdominais, prostração, dor muscular, queda de pressão sanguínea, que aparecem em uma a seis horas após a ingestão do alimento contaminado (BERGDOLL, 1988).

Segundo FRAZIER & WESTHOFF (1979) a intoxicação estafilocócica normalmente não é registrada ou divulgada, a não ser que ocorram surtos de grande proporções, como em piqueniques, grandes jantares ou banquetes. É sabido, no en-

tanto, que uma grande porcentagem de todos os casos relatados como intoxicação alimentar ou infecção alimentar, é na realidade intoxicação estafilocócica e muitos de nós encontraremos esta doença durante nossa vida. A recuperação ocorre em 24 horas, podendo ocasionalmente levar alguns dias (ICMSF, 1978).

PELCZAR et alii (1981) afirmam que essa intoxicação, além da sintomatologia já citada, poderá ter um comprometimento mais sério, às vezes letal, quando se trata de crianças pequenas ou de pessoas debilitadas.

O *S. aureus* é ubíquo e pode chegar até os alimentos de várias fontes. Pode provir, o que é mais comum, de manipuladores de alimentos que tenham infecções piogênicas agudas, ou ainda de portadores sãos, que alojem esses germes nas fossas nasais, na garganta ou na pele, já que o homem é considerado como sendo o maior reservatório natural de estafilococos (ICMSF, 1978 e PELCZAR et alii, 1981).

WEISER et alii (1971), através de estudos a respeito da epidemiologia do *S. aureus*, associada com manuseio de alimentos, concluíram que, em mais de mil pessoas estudadas, num levantamento, aproximadamente 60% eram portadores de estafilococos na garganta e nas fossas nasais e 20 a 25% destes eram portadores de estafilococos coagulase positiva.

Esses resultados são significativos, sob o ponto de vista de que as pessoas que manuseiam alimentos podem

contaminá-los, e se houver condições para o seu crescimento e desenvolvimento, certamente, enterotoxinas serão formadas e intoxicarão as pessoas que os ingerirem. É também sob este aspecto das intoxicações que o controle de qualidade dos produtos alimentares encara os riscos microbiológicos. Segundo EIROA (1977), estes riscos são atributos indesejáveis e ocupam o primeiro lugar numa escala de prioridades.

Para que ocorra um surto de intoxicação alimentar estafilocócica, de acordo com FRAZIER & WESTHOFF (1978), é necessário que:

- a) O alimento contenha estafilococos produtores de enterotoxina.
- b) O alimento seja um bom meio de cultura para crescimento e produção de enterotoxinas pelos estafilococos.
- c) A temperatura seja favorável para o crescimento dos cocos e o tempo seja suficiente para que produza a toxina.
- d) O alimento contendo a toxina seja ingerido.

O surto pode ser evitado, de acordo com FRAZIER & WESTHOFF (1978) mediante:

- a) Prevenção da contaminação dos alimentos por estafilococos, aplicando práticas sanitárias e utilizando matéria prima livre dos cocos.

- b) Prevenção do crescimento dos estafilococos pela aplicação de tratamento térmico adequado durante o processamento e também, em alguns casos, ajuste de pH mais ácido ou ainda adição de substâncias bacteriostáticas, como a serina ou um antibiótico.
- c) Alguns alimentos podem ser pasteurizados para destruir os estafilococos ou conservados a temperaturas baixas para limitar o seu desenvolvimento.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a ocorrência e distribuição de linhagens de *S. aureus*, produtoras de enterotoxinas, isoladas de fossas nasais de eventuais portadores e de algumas amostras clínicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE S. AUREUS

O *S. aureus* em particular constitui uma espécie bacteriana muito bem conhecida pelas patologias provocadas em homens e animais.

No ano de 1878, Koch observou pela primeira vez os micrococos, quando examinava uma amostra de pus; mas a constatação frequente destas bactérias em abscessos agudos e crônicos deve-se a Ogston em 1881. Pasteur obteve o cultivo dessa bactéria em meio líquido, no ano de 1880, mas o seu isolamento em cultura pura só foi realizado em 1884 por Rosenbach. O nome genérico de *Staphylococcus* foi adotado por Rosenbach, que posteriormente o dividiu em duas espécies: *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus*. Uma terceira espécie foi adicionada por Passet em 1885, o *Staphylococcus pyogenes citreus*. Ao longo dos anos surgiram muitas controvérsias sobre a posição sistemática dessas bactérias (WILSON & MILES, 1948).

A sistemática bacteriológica apresentou na 8ª

edição do BERGEY's "Manual of Determinative Bacteriology", três espécies do gênero *Staphylococcus* da família *Micrococcaceae*: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (BAIRD - PARKER, 1974).

Através de técnicas desenvolvidas nos últimos anos, podem-se hoje classificar os estafilococos em 19 espécies, assim distribuídos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, subsp 1 e subsp 2, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* subsp *hyicus* e subsp *chromogenes*, *S. caseolyticus*, *S. sciuri* subsp. *sciuri* e subsp. *lentus*, *S. gallinarum*, *S. caprae* (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

Desde que extensivas revisões no gênero *Staphylococcus* têm ocorrido, a coagulase e a termonuclease, que são provas simples, e práticas usadas rotineiramente para a identificação de *S. aureus*, têm levado a resultados errôneos na sua designação, pois algumas linhagens de *S. intermedius* e *S. hyicus* subsp *hyicus* são também consideradas positivas para estas mesmas provas (TATINI et alii, 1984).

Segundo FRANCO & NIELSEN (1988), a utilização de uma prova rápida de aglutinação em lâminas para identificação de culturas de *S. aureus* isoladas de alimento, o "Staphy Test", quando submetido simultaneamente com a prova da coagulase em tubo na identificação das culturas de *S. aureus* isoladas de alimentos, mostrou uma correlação de

99,2% entre elas, sendo a sensibilidade do "Staphy Test" de 98,8% e a especificidade de 100%.

Geralmente, o crescimento do *S. aureus* em meio sólido apresenta-se de cor dourada ou amarela, mas pode não ser pigmentado; as culturas produtoras de enterotoxinas são coagulase-positivas, mas nem todas as culturas coagulase positivas são necessariamente enterotoxigênicas (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

O *S. aureus*, quando presente no alimento em condições favoráveis ao seu crescimento, pode em algumas horas atingir números elevados. As características fisiológicas dessa bactéria podem influir para que ocorra a sua multiplicação. De acordo com KLOOS & SCHLEIFER (1986), o *S. aureus* pode multiplicar-se em temperaturas que variem de 10 a 45°C, estando a faixa ótima entre 30 e 37°C.

Segundo FRAZIER & WESTHOFF (1978), de maneira geral, a temperatura varia de 4 a 46°C para o desenvolvimento e produção de toxinas e, ainda, de acordo com o alimento; é claro que nas temperaturas mais baixas, o crescimento é muito lento e o tempo para que alcance um número suficiente de células para produzir níveis detectáveis de toxina é muito mais extenso do que o período de armazenamento do alimento refrigerado.

Entretanto outros autores referem como temperaturas mínima, ótima e máxima, respectivamente, 6,7°C, 37°C e 45,5°C (ANGELOTTI et alii, 1961), 6,6°C, 35°C e 47°C (FRA-

ZIER, 1972) e 10°C, 35°C - 37°C e 45°C (GILBERT, 1974 e JENNINGS, 1975).

O pH mínimo para o desenvolvimento do *S. aureus* é menor em condição aeróbica do que em anaeróbica; em carnes, por exemplo, o pH mínimo para desenvolvimento é 4,8 em aerobiose, e 5,5 em anaerobiose, enquanto que o pH máximo para desenvolvimento está em torno de 8,0 (FRAZIER & WESTHOFF, 1978). Por outro lado, KLOOS & SCHLEIFER (1986) afirmam que o *S. aureus* multiplica-se em meios com pH dentro de uma faixa de 4,2 a 9,3, com ótimo entre 7,0 e 7,5.

Segundo JAY (1973) de forma geral aceita - se atualmente que as necessidades dos microrganismos, em relação a água, devem ser expressas em termos de "atividade de água" (a_w) do meio (alimento). A "atividade de água" é o quociente do valor da pressão de vapor d'água da solução no alimento dividido pelo valor da pressão de vapor d'água pura. Para esta a razão a_w é de 1,0. O valor de a_w é influenciado pelo grau de umidade relativa da atmosfera ao redor do alimento. Quanto maior for a umidade relativa, maior será a razão a_w na superfície do alimento e inversamente. Este autor afirma que, segundo Christian, a umidade relativa é igual a cem vezes a razão a_w . Para o *S. aureus*, a razão a_w ótima para que se multiplique é de 0,990 a 0,995, sendo o limite mínimo 0,86, valor este relativamente baixo, sendo que para muitas espécies bacterianas a razão a_w mínima ainda compatível com sua multiplicação é de 0,90. De acordo com FRAZIER

& WESTHOFF (1978), o mínimo de a_w é 0,86 em condição aeróbica e 0,90 em anaeróbica.

O *S. aureus* resiste bem a teores altos de cloreto de sódio, podendo crescer mesmo em concentrações desse sal próximas da saturação (FRAZIER, 1972 e JENNINGS, 1975).

A maioria das linhagens de *S. aureus* multiplicam-se bem em meios com 10% de cloreto de sódio (KLOOS & SCHLEIFER, 1986), tendo um crescimento pobre a 15%. Algumas linhagens podem crescer em até 20% (JAY, 1973 e FRAZIER & WESTHOFF, 1978). O caráter halofílico dessa bactéria é muito importante, porque ela pode multiplicar-se mesmo em alimentos cujo processo de conservação se resume no uso de salmoura. Por outro lado, pode manter-se apenas viva em produtos salgados com razão a_w muito reduzida. Contudo, se a umidade for alta, e a temperatura favorável, pode ocorrer multiplicação.

Com relação à sacarose, segundo FRAZIER & WESTHOFF (1978), o *S. aureus* pode ser tolerante a concentrações em torno de 50 a 60%.

Em condições favoráveis, o *S. aureus* pode multiplicar-se na superfície do alimento ou ainda, por ser bactéria anaeróbica facultativa, pode crescer em profundidade. Dependendo da linhagem, pode ocorrer, durante a multiplicação, produção de toxina termo-estável denominada "enterotoxina estafilocócica", responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica. Essa denominação se deve a problemas intestinais causados por ela.

2.2. A INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

De acordo com DACK (1962), não se sabe há quanto tempo a intoxicação alimentar estafilocócica aflige o homem, porém, indubitavelmente deve ser há séculos. O primeiro pesquisador a estudar os sintomas deste tipo de intoxicação foi Vaughan em 1884, o qual reproduziu em si mesmo, em vários experimentos, a sintomatologia da doença, após ingerir extrato alcoólico de queijo causador de intoxicação. JAY (1973) cita que, em 1914, um estudo semelhante foi realizado por Barber, que também introduziu os sintomas da afecção em si mesmo, ingerindo leite contaminado com culturas de *S. aureus*.

Em 1885, Sternberg, examinando líquido de cavidade de um queijo relacionado com casos de intoxicação alimentar, verificou a presença de grande quantidade de micrococos ao lado de outros microrganismos. Realizada a cultura em caldo a partir desse produto, ele obteve um crescimento quase exclusivo de micrococos. Mais tarde, este autor tentou reproduzir os sintomas da intoxicação em outros animais, inoculando essa cultura por via subcutânea em coelhos, cães e ratos, e ministrando, por via oral, a um cão, o extrato alcoólico do mesmo queijo. Nenhum dos animais apresentou os sintomas da intoxicação. Por outro lado, um voluntário ingeriu cerca de 15 gramas do queijo e após duas horas e meia foi acometido de náuseas, vômitos e diarréia. Diante disto Stern

berg, concluiu que parecia provável, ser o princípio venenoso uma "ptomaina" desenvolvida no queijo, resultante da atividade vital dos micrococos encontrados ou de algum outro microorganismo que os precedeu e que talvez tivesse sido morto pelos seus próprios produtos tóxicos (citado por DACK, 1962).

Segundo DACK (1962), carnes com quantidade elevada de estafilococos foram posteriormente relacionadas por Dennis em 1894 e Owen em 1906, a casos de intoxicação alimentar. Mas foi somente em 1930 que se iniciou a era moderna na aquisição de conhecimentos sobre a intoxicação alimentar estafilocócica.

Uma grande variedade de alimentos é hoje conhecida, por seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Produtos como presuntos, frangos e doces recheados com creme, são os mais envolvidos, e 75% de todas as intoxicações alimentares por estafilococos são devidas a refrigeração inadequada dos alimentos. Outros alimentos envolvidos são carnes e seus produtos, peixes e seus produtos, leite e seus produtos, saladas, pudins, molhos, macarrões e tortas. Produtos muito ácidos para que os estafilococos possam se desenvolver, podem ter sua acidez reduzida, quando alguns ingredientes são adicionados como: ovos, ou cremes, tornando-os perigosos. O crescimento e produção de enterotoxinas pelos estafilococos podem ter lugar nas mesas de vapor em restaurantes, nas estufas em bares e cantinas, que mantêm os alimentos aquecidos por períodos longos, se a tem-

peratura e o tempo de exposição não forem apropriadamente controlados (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

Nem todas as pessoas que ingerem enterotoxina estafilocócica desenvolvem o quadro clínico de intoxicação, pois existe variação individual quanto a suscetibilidade a esse produto tóxico elaborado pelo *S. aureus*. Quando um grupo de indivíduos ingere um alimento contendo enterotoxina estafilocócica, alguns desenvolvem um quadro clínico severo de intoxicação, enquanto outros apresentam pequena indisposição ou nenhuma (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

2.3. AS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

No diagnóstico de um surto de intoxicação alimentar, é necessário verificar a presença da enterotoxina estafilocócica nos alimentos suspeitos (DACK, 1962).

A pesquisa da enterotoxina foi realizada por muito tempo ministrando-se os alimentos suspeitos, ou sobrenadantes ou filtrados de culturas de linhagens de *S. aureus* isoladas a partir deles, em voluntários humanos, macacos e gatos (REIMANN, 1972 e BERGDOLL, 1988).

A técnica da inoculação de filtrados de culturas de *S. aureus* implicados em surtos de intoxicação alimentar na cavidade abdominal de gatos de pouca idade, com peso entre 250 a 500 gramas, foi descrita por DOLMAN et alii (1936),

onde os filtrados eram injetados após tratamento por calor e formol. Estes filtrados provocaram vômitos e diarréias nos animais submetidos à prova. Segundo DOLMAN & WILSON (1938) o mesmo gato podia ser reutilizado em outras provas semelhantes, desde que dentro de um prazo de 7 a 10 dias, pois desenvolvia imunidade em 2 a 3 semanas.

Até recentemente empregavam-se métodos de detecção, injetando-se extratos intraperitoneal e intravenoso em gatos (DOLMAN & WILSON, 1940), e alimentando-se com extratos pequenos macacos Rhesus (*Macaca mulata*) (SURGALA et alii, 1953). Por terem estes métodos um alto custo na manutenção dos animais, e não serem inteiramente fidedignos, eles foram substituídos pelos métodos sorológicos (ICMSF, 1978) que serão tratados posteriormente.

SURGALA (1947) obteve o crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas em meios sintéticos contendo sais inorgânicos, glicose, tiamina, ácido nicotínico e 2 a 16 aminoácidos, onde, dentre os meios mais simples que o autor usou, o que continha arginina e cistina demonstrou os melhores resultados. Em meios que continham 3 aminoácidos e ausência de glicose, não ocorreu o crescimento do *S. aureus* e, conseqüentemente produção de enterotoxina. O autor demonstrou que nos meios com 0,2 a 20% de glicose o crescimento e a produção de enterotoxinas ocorria.

Um outro método foi apresentado por HALLANDER (1965), no qual a enterotoxina e outras toxinas estafilocó-

cicas foram produzidas em grandes quantidades, por meio de cultura sólida em placas de Petri coberto com celofane. O autor empregou o meio de CASMAN (1958) modificado, constituído de hidrolizado de caseína, vitaminas, cisteína, triptofano, citrato de ferro, sulfato de magnésio e de sódio, e agar.

DONNELLY et alii (1967), demonstraram outro processo, para a produção de enterotoxinas pelo *S. aureus*, onde um saco de celofane contendo 100 ml de caldo infusão de cérebro e coração, é colocado num Erlenmeyer de 250 ml e por intermédio de um barbante é fixado no gargalo do frasco. O conjunto é esterilizado e em seguida são depositados no fundo do frasco dois mililitros de uma suspensão de *S. aureus*, obtida de cultura de 24 horas a 37°C, em agar inclinado de infusão de cérebro e coração. São adicionados também ao redor do saco de celofane, 20 ml de água fosfatada a pH 7,0. Após a inoculação a 35-37°C por 48 horas, a suspensão de *S. aureus* é retirada do frasco e centrifugada, e no líquido sobrenadante pesquisa-se a presença da enterotoxina.

Vários métodos para a produção de enterotoxina foram comparativamente avaliados (SIMKOVICOVA & GILBERT, 1971) e só nos métodos do saco de celofane para diálise de CASMAN & BENNETT (1963) e de DONNELLY et alii (1967), foram conseguidas concentrações elevadas de enterotoxinas. A preferência dada pelos autores foi pela utilização do segundo método, devido a facilidade no preparo do frasco de cultura, na inoculação e na recuperação da suspensão de *S.*

aureus do frasco. Similares nos seus princípios, estes métodos são amplamente utilizados por inúmeros laboratórios da Europa e Estados Unidos com sucesso. O primeiro produz grande quantidade de toxinas, mas o segundo é mais fácil de se reproduzir (ICMSF, 1978).

O método de celofane sobre agar (HALLANDER, 1965; JARVIS & LAWRENCE, 1970; ROBBINS et alii, 1974) também tem se mostrado bem sucedido, tal qual o do agar semi-sólido (CASMAN & BENNETT, 1963). Ambos tem a vantagem de serem facilmente reproduzidos (ICMSF, 1978).

Nos estudos relativos a antigenicidade da enterotoxina estafilocócica realizados por DOLMAN et alii (1936), foi comprovado que o soro sanguíneo de um gato, que se tornara resistente à enterotoxina estafilocócica, neutralizava esse produto tóxico. Esta constatação foi feita, quando inoculava-se em gatos jovens uma mistura do soro de gato resistente com a enterotoxina estafilocócica por via intraperitoneal.

Os primeiros pesquisadores a relatar o encontro do que parecia ser anticorpo específico contra a enterotoxina estafilocócica, foram DOLMAN & WILSON (1938), que verificaram que gatos, coelhos e cavalos imunizados ativamente com filtrados de culturas de *S. aureus* enterotoxigênicos produziam anticorpos que protegiam gatos jovens contra a ação da enterotoxina. Os autores demonstraram neste estudo uma reação de floculação específica, aparentemente envolvendo a enterotoxina e seu anticorpo específico.

SURGALA et alii (1954), descobriram que soros imunes, produzidos em coelhos por inoculação da enterotoxina parcialmente purificada, neutralizavam completamente este produto tóxico.

Uma pesquisa para determinar o valor dos procedimentos sorológicos, e o desenvolvimento de uma prova prática para evidenciar a enterotoxina estafilocócica, realizada por CASMAN (1958) demonstrou conclusivamente a antigenicidade da enterotoxina e, quando eram usadas anti-enterotoxinas produzidas em coelhos, constatou proteção passiva em gatos, contra as enterotoxinas elaboradas por linhagens homólogas e heterólogas de *S. aureus*. O autor aplicando a prova de difusão em agar, não conseguiu detectar o antígeno exclusivo das linhagens enterotoxigênicas, e sugeriu que novas investigações fossem realizadas a esse respeito, com base na possível existência de mais de um tipo de enterotoxina estafilocócica.

Empregando uma enterotoxina parcialmente purificada, elaborada pela clássica linhagem S-6, e o soro específico produzido por meio da imunização de coelhos BERGDOLL et alii (1959), observaram pela técnica de difusão em agar, reação de precipitação positiva e reação cruzada com enterotoxina produzida por mais 13 linhagens de *S. aureus*. Por outro lado, a reação foi negativa em prova realizada com enterotoxina elaborada pela também clássica linhagem 196-E, o que tornou possível identificar linhagens produtoras de duas enterotoxinas.

CASMAN (1960), pesquisando com soros anti-enterotóxicos produzidos pela inoculação em coelhos, de enterotoxinas elaboradas pelas linhagens S-6, 196-E e 243, verificou que a maioria das linhagens originárias de casos de enterite testados, produziam duas toxinas, iguais as produzidas pelas linhagens S-6 e 196-E, sendo que outras linhagens associadas a casos de intoxicação alimentar também testadas, produziam somente uma toxina, idêntica a produzida pela linhagem 196-E. O autor designou provisoriamente as duas toxinas de tipo "E" (Enteritis) e tipo "F" (Food-poisoning). A linhagem S-6 e as de enterite produziam então enterotoxinas tipo "E" e "F", a linhagem 196-E e as associadas a casos de intoxicação alimentar produziam a tipo "F", enquanto que a linhagem 243 produzia a do tipo "E".

Durante a realização da 62ª Reunião Anual da Associação Americana de Microbiologia, no dia 9 de maio de 1962, na cidade de Kansas, EUA (CASMAN et alii, 1963), ficou estabelecido que as enterotoxinas estafilocócicas seriam designadas por letras maiúsculas, seguindo a ordem do alfabeto. Assim as enterotoxinas tipo "F" e "E" foram designadas tipo "A" e "B", sendo suas linhagens protótipo a 196-E (ATCC-13565) e a 243 (ATCC-14458), respectivamente.

Posteriormente, foram identificados mais 3 tipos de enterotoxina estafilocócica: o tipo "C" da linhagem protótipo 137 (ATCC-23235) BERGDOLL et alii (1965), o tipo D da linhagem protótipo 494 (ATCC-23235) CASMAN et alii (1967), e

o tipo E da linhagem protótipo FRI (Food Research Institute) 326 BERGDOLL et alii (1971).

Através de estudos de purificação e análise da estrutura molecular, constatou-se que as enterotoxinas estafilocócicas são constituídas de uma cadeia polipeptídica única, que contém quantidades relativamente grandes de aminoácidos, como lisina, tirosina, ácidos aspártico e glutâmico, e apresentam peso molecular entre 26.000 e 35.000 (SCHANTZ et alii, 1965; CHU et alii, 1966; BORJA & BERGDOLL, 1967; AVE-NA & BERGDOLL, 1967; HUANG et alii, 1967; SCHANTZ et alii, 1972 e FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

De acordo com Bergdoll, citado por JAY (1973), as enterotoxinas estafilocócicas são resistentes a certas enzimas proteolíticas como a tripsina, quimiotripsina, renina e papaína, porém são sensíveis à pepsina em pH de 2,0, aproximadamente.

A resistência térmica das enterotoxinas estafilocócicas foi constatada há cerca de 50 anos por DOLMAN et alii (1936) e DAVISON et alii (1938) ao inocularem filtrados fervidos de culturas de *S. aureus*, isolados de alimentos que causaram surtos de intoxicação alimentar, em macacos e gatos.

SURGALLA & HITE (1945) constataram que filtrados de culturas de linhagens de *S. aureus* produtoras de toxinas, os quais, mesmo após fervidos por 30 a 40 minutos, provocavam vômitos quando ministrados a gatos e a macacos, SCHANIZ

et alii (1965) observaram que a atividade biológica da enterotoxina tipo B diminui com o aquecimento a 60°C por 16 horas em pH 7,3.

A inativação da enterotoxina tipo A a 121°C por 11 minutos, foi demonstrada pela ausência de vômitos em gatos, após a sua inoculação. Resposta semelhante foi obtida quando a enterotoxina estafilocócica, previamente autoclavada a 121°C por 8 minutos, foi ministrada a macacos (DENNY et alii, 1966).

De acordo com JAY (1973), é possível que a termo-resistência da enterotoxina estafilocócica, nos alimentos, seja maior que a observada nos sistemas usados em ensaios de laboratório com o intuito de verificar a resistência dessas toxinas ao calor.

De maneira geral, os tratamentos térmicos, como a pasteurização (72°C por 15 segundos) e o UHT (ultra-high-temperature, 143,3°C por 9 segundos) podem não ser suficientes para inativar as enterotoxinas. A enterotoxina tipo B é a mais resistente das toxinas (FRAZIER & WHESTOFF, 1978).

A detecção das enterotoxinas estafilocócicas, em sobrenadantes de culturas de *S. aureus* e em alimentos, pelo uso de técnicas sorológicas, só foi possível após a realização de estudos sobre a sua purificação e antigenicidade, sendo que esses processos sorológicos de detecção das enterotoxinas são mais sensíveis e mais econômicos do que aqueles que se baseavam na ministração oral de filtrados de

cultura de *S. aureus* ou na inoculação intraperitoneal em gatos (CASMAN & BENNETT, 1963; HALL et alii, 1963; CASMAN & BENNETT, 1965; DONNELLY et alii, 1967).

Os métodos para a detecção dos vários tipos de enterotoxinas, atualmente estabelecidos como sorológicos, incluem o uso de anticorpos específicos. Contudo, as diferenças antigênicas complicam a detecção, porque cada tipo deve ser determinado separadamente. Um outro problema secundário, é que ainda existem enterotoxinas que não foram identificadas, uma vez que os anticorpos específicos não estão disponíveis, não é possível detectá-las. Isto, no entanto, parece ser responsável somente por um pequeno número de casos de intoxicação alimentar (GILBERT, 1974).

Inúmeros métodos, que empregam os anticorpos específicos, são usados de várias maneiras para a detecção sorológica e a medição das enterotoxinas (BERGDOLL, 1972). Entre eles incluem-se: a difusão simples em agar (HALL et alii, 1963), a técnica de "microslide" (CASMAN & BENNETT, 1963), a técnica de Ouchterlony (BERGDOLL et alii, 1965 e GILBERT, 1974), o teste de anticorpos fluorescentes (GENIGEORGIS & SADLER, 1966), a inibição por hemoaglutinação (MORSE & MAH, 1967 e JOHNSON et alii, 1971), a hemoaglutinação passiva (SILVERMAN et alii, 1968), o radio-imuno-ensaio "RIA" (JOHNSON et alii, 1971 e COLLINS et alii, 1972 e 1973) e a técnica "ELISA" (Enzyme-linked immunosorbent assay) (FREED et alii, 1982).

Por causa das pequenas quantidades de enterotoxinas normalmente encontradas nos alimentos em surtos de intoxicação, os métodos selecionados para análises devem ser sensíveis e aplicados a todas as enterotoxinas conhecidas. A sensibilidade do teste "microslide" é normalmente de 0,1 µg de enterotoxina por mililitro da amostra, sendo que pode ser aumentada pela alteração de alguns parâmetros, como a concentração dos reagentes e a espessura do agar (BENNETT et alii, 1970). Este grau de sensibilidade é adequado quando o alimento é concentrado. Outros métodos de sensibilidade elevada, como a hemoaglutinação e o radio-imuno-ensaio, não requerem técnicas de concentração dos extratos de alimentos, o que consome um tempo menor para a realização das análises (ICMSF, 1978).

Segundo BERGDOLL & BENNETT (1984), a utilização dos métodos como o radio-imuno-ensaio (RIA), a hemoaglutinação e "enzima-linked immunosorbent assay" (ELISA) é um pouco prematura, pois, devido a problemas encontrados por alguns pesquisadores, uma melhor avaliação destes métodos deve ser aguardada.

Muitos métodos "ELISA" foram propostos para a detecção de enterotoxinas em alimentos e este poderá vir a ser o do futuro, pela relativa facilidade com que pode ser realizado, e o fato de que o ensaio pode ser completado em um dia (BERGDOLL & BENNETT, 1984).

Para a extração e a concentração de enteroto-

xinas, em alimentos, muitos métodos têm sido propostos (BERG DOLL, 1972), no entanto somente alguns são usados (CASMAN & BENNETT, 1965; HALL et alii, 1965; REISER et alii, 1974), nos ensaios com alimentos incriminados em surtos de intoxicação.

Hoje existe no mercado, um "kit" comercializado pela empresa "Toxin Technology, Inc.", localizada na cidade de Madison, WI, EUA, com o nome de "SET-EIA" o qual analisa as enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A, B, C e D diretamente dos alimentos, sem os complicados passos de extração e concentração requeridos por outros métodos, além de ter uma sensibilidade limite para detectar níveis de 0,1 a 1,0 ng de enterotoxina por mililitro.

2.4. ESTUDOS DE *S. aureus* E ENTEROTOXINAS NO BRASIL

Segundo LEITÃO et alii (1973), após estudos microbiológicos de vários alimentos desidratados, o *S. aureus* foi constatado em 14,0% das amostras analisadas, sendo que apenas nas de coco e pimenta as contagens eram superiores a 10^2 /g.

DELAZARI & LEITÃO (1976) constatararam a presença de 69,5% de *S. aureus*, em números variáveis de 10^1 a $>10^4$ /g, na amostragem de macarrão de produção industrial. Os autores verificaram, também, uma correspondência muito alta entre os testes de coagulase e DNase termoestável aplicados a

327 culturas de *Staphylococcus* isoladas, principalmente quando a intensidade de coagulação do plasma era elevado (reações 4+ e 3+). De um total de 106 culturas positivas nas duas determinações, 63,0% foram confirmadas como sendo enteropatogênicas, produzindo enterotoxinas tipo A, A e B, B, C, D e E, sendo 31,1%, 4,7%, 7,5%, 3,7%, 12,2% e 3,7% respectivamente.

De acordo com IARIA (1978), em uma amostragem de 100 unidades de doces de consistência cremosa ou com creme natural ou artificial de recheio e/ou de cobertura, comercializados por padarias e confeitarias na cidade de São Paulo, apresentou uma contaminação por *S. aureus* de 38,0%, dos quais 18,4% eram linhagens produtoras de enterotoxinas dos tipos B, C e D, com predominância do tipo C (71,4%).

HIROOKA et alii (1982), realizaram um estudo de bacterimetria de *S. aureus*, em produtos cárneos embutidos comercializados na cidade de Londrina, Paraná, com um total de 139 amostras (85 linguiças e 54 salsichas); linhagens de *S. aureus* foram isoladas em 57 (67,0%) das amostras de linguiças e 18 (33,3%) das de salsichas, sendo que 46 (55,3%) e 6 (11,1%) apresentaram-se com número superior a 10^3 /g, respectivamente.

HIROOKA & MÜLLER (1982), pesquisando as características de 107 linhagens de estafilococos, isoladas de 139 amostras de produtos cárneos embutidos, comercializados em Londrina, Paraná, verificaram que 70,1% das linhagens foram

coagulase positivas e 87,9% manitol positivas, o que mostrou haver pouca relação entre os dois testes. De 85 linhagens examinadas pela prova de coagulase e termonuclease, os resultados indicaram uma correlação de 94,1%. Estas mesmas linhagens, quando examinadas pelo teste de cristal violeta, apresentaram os seguintes resultados: 52 (61%) grupo A, 30 (35,5%) grupo B e 3 (3,5%) grupo E. Testando 75 linhagens de *S. aureus*, para produção de enterotoxinas, obtiveram o seguinte resultado: produção das enterotoxinas tipo A, B, C e E, com porcentagens de 62,5%, 12,5%, 15,6% e 6,2%, respectivamente, além de uma linhagem produtora dos tipos A e C, correspondendo a 3,1%.

As condições higiênico-sanitárias do charque comercializado na cidade de São Paulo, foram observadas por FRANCO et alii (1987), onde o *S. aureus* apresentou-se em 15,4% das amostras, sempre com contagens entre 10^2 e 10^3 UFC/g (UFC = unidade formadora de colônias).

NOLETO & TIBANA (1987), isolaram culturas de *S. aureus*, produtoras de enterotoxina tipo B, a partir de carne assada recheada com paio, causadora de um surto de intoxicação estafilocócica. O período de incubação variou de 2 a 7 horas, e 6 pessoas foram hospitalizadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus*

3.1.1. Amostras

Para o presente trabalho coletou-se amostras de fossas nasais através de "swabs", de 122 pessoas supostamente portadoras eventuais e ainda utilizou-se linhagens de *S. aureus* cedidas pela Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" (FTPT) de Campinas, sabidamente produtoras de enterotoxinas como controle.

3.1.2. Meios de cultura

Para o isolamento de *S. aureus* de portadores eventuais utilizou-se o meio *Staphylococcus* N° 110. Nas provas de identificação, usou-se caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), agar nutriente e agar toluidina azul / DNA (Apêndice 1).

3.1.3. Corantes

Foram utilizados os normalmente aplicados na coloração de Gram.

3.1.4. Soluções e reagentes

Usaram-se a solução de lugol e álcool etílico a 95% para a coloração de Gram, o "Coagu-Plasma" do laboratório Laborclin, para a prova da coagulase, e o "Staphy-Test" da Probac do Brasil para a identificação de *S. aureus*.

3.1.5. Outros materiais

Foram os de uso rotineiro em pesquisas bacteriológicas, tais como: pipetas bacteriológicas, pipetas de Pasteur, placas de Petri, "beakers", Erlenmeyers, lâminas para microscopia, incubadoras, microscópio, alca de platina, tubos de ensaio, algodão, "swabs" ou cotonetes estéreis e bico de Bunsen.

3.2. MATERIAL PARA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

3.2.1. Amostras

Foram estudadas: linhagens de *S. aureus* isola

das de fossas nasais; linhagens de *S. aureus* cedidas pelo Centro de Patologia Clínica Preventiva, PREV-LAB de Piracicaba, isoladas de espécimes clínicas como abscessos e secreções (amostras clínicas) e linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas cedidas pela Coleção de Culturas Tropical da FTPT, Campinas.

3.2.2. Meios de cultura

Foram o meio agar infusão de cérebro e coração e o caldo de infusão de cérebro e coração com dupla concentração, para a inoculação das amostras (Apêndice 1).

3.2.3. Solução

Foi usada a solução tampão salina fosfatada 0,02M e pH 7,4 para uso na suspensão e inoculação das linhagens, nos frascos apropriados e Merthiolate 1:1000 do laboratório Lilly.

3.2.4. Outros materiais

Além dos usados rotineiramente em laboratório

de microbiologia, utilizaram-se saco para diálises 33x21 mm INLAB, barbante, "shaker" com temperatura controlada da Lab-Instruments Inc. Cat. nº 3570, tubos para centrífuga esterilizáveis de 50 ml, centrífuga Servall - ultra speed da marca Ivan Sorvall Inc. Modelo SS-1, medidor de rotações por minuto (Jaquet's indicator) da marca H.H. Sticht Co. N.Y. e frascos de vidro para volumes de 50 ml com tampa plástica.

3.3. MATERIAL PARA CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

3.3.1. Amostras

Usou-se o sobrenadante das culturas de *S. aureus* submetidas ao método de produção de enterotoxinas.

3.3.2. Meios de cultura

Usaram-se o agar 1,2% preparado com solução tampão salina fosfatada 0,02M mais Merthiolate 1:10.000, caldo infusão de cérebro e coração mais Merthiolate 1:10.000 e caldo infusão de cérebro e coração 0,3% em solução tampão salina fosfatada 0,02M.

3.3.3. Soluções e reagentes

Utilizaram-se a solução tampão salina fosfata da 0,02M e pH 7,4, Merthiolate 1:1.000, reagentes liofilizados das enterotoxinas tipo A, B, C₃ e D, reagentes liofilizados das anti-enterotoxinas tipo A, B, C₃ e D e ácido fosfórico 0,1M.

3.3.4. Outros materiais

Usaram-se: molde para as perfurações do agar em papel cartão (Apêndice 2, Figura 1), placas de Petri 12x52mm, cortadores de rolhas, caixa plástica FLEX-A Cario-ca 20.734, "beakers" de 50 ml, incubadora, contador de colônias Quebec Modelo 3330, trompa para vácuo e pipetas de Pasteur.

3.4. MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus* (OXOID LIMITED, 1976; ICMSF, 1978)

3.4.1. Isolamento de diferentes portadores eventuais

Com um "swab" (cotonete) colocado em um tubo de ensaio 10x95mm, tamponado e esterilizado em autoclave a

121°C por 15 minutos, passando-o nas paredes laterais da fossa nasal, colhia-se material que era imediatamente semeado em estrias, numa placa de Petri 20x75mm com 15ml de meio *Staphylococcus* N° 110 (Oxoid CM 145), previamente preparado conforme as instruções do fabricante e distribuído nas placas.

Após semear o material, a placa era incubada a 37°C por 43 horas. Examinava-se a mesma depois do período de incubação e observava-se um crescimento com colônias de coloração amarela, e às vezes branca, circulares, com diâmetros que variavam de 1 a 3 mm, lisas e pouco convexas. Seleccionavam-se estas colônias e preparavam-se esfregaços em lâminas, corando-as em seguida pelo método de Gram (ICMSF, 1978).

As colônias que apresentaram, ao microscópio, cocos Gram positivos com característica de estafilococos, eram transferidas por uma alça para tubos 10x95mm com 2,0 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (Oxoid-CM 225), preparado conforme instruções do fabricante, tamponados com algodão. As colônias suspeitas eram transferidas também para tubos com agar nutriente (Difco - Bacto 001) inclinados, preparados conforme instruções do fabricante.

3.4.2. Prova da coagulase (TATINI et alii, 1984)

Os tubos com a suspensão e os inclinados das colônias suspeitas eram incubados a 37°C por 24 horas, sendo que os tubos com agar nutriente inclinados eram conservados

à temperatura ambiente, após a incubação, para eventuais repetições.

Em tubos 10x75 mm estéreis, adicionava-se 0,5 ml de "Coagu-plasma" e 0,2 ml da suspensão das colônias suspeitas do tubo com caldo de infusão de cérebro e coração, misturava-se vagarosamente e incubava-se a 37°C examinando-se a intervalos, durante 6 horas. A formação de coágulos era interpretada conforme Apêndice 3 (Figura 2).

Os resultados 3+ e 4+ eram considerados positivos para *S. aureus*, e 1+, 2+ eram confirmados pela prova da termonuclease. Aplicou-se também esta prova nos testes 3+ e 4+.

3.4.3. Prova de termonuclease (ICMSF, 1978)

Sobre uma lâmina de microscópio 25x75mm seca e limpa, eram adicionados 3,0 ml de agar toluidina azul /DNA derretido. Após a solidificação, faziam-se pequenos orifícios no agar (2,0 mm), usando tubos capilares estéreis ligados a uma trompa. Cada lâmina comportava 14 orifícios, o que dava para realizar sete testes em duplicata por lâmina.

Com uma pipeta de Pasteur, adicionavam-se a cada orifício aproximadamente 10 µl da amostra. Esta amostra era a suspensão das colônias suspeitas, do caldo de infusão de cérebro e coração utilizada no teste da coagulase, aquecida por 15 minutos em água fervente e resfriada.

Após preencher os orifícios com as amostras a

serem testadas, a lâmina era colocada dentro de uma placa de Petri 18x145 mm com um pedaço de algodão umidecido (câmara úmida) no seu interior e incubada por 4 horas a 37°C. A reação positiva era caracterizada pela formação de um halo rosa claro de no mínimo 1,0 mm ao redor do orifício.

A positividade neste teste caracterizava as colônias suspeitas, com resultados positivos na prova da coagulase, como sendo *S. aureus*.

3.4.4. Prova do "Staphy-Test" PROBAC do Brasil

(FRANCO & NIELSEN, 1988)

Esta prova, baseada na capacidade do *S. aureus*, de aglutinar hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com hemolisina e fibrinogênio foi realizada com todas as amostras coagulase e termonuclease positivos.

Nesta prova utilizavam-se dois reagentes que compõem o "kit" Staphy-Test R e Staphy Test C. O primeiro contém hemácias sensibilizadas com hemolisina e fibrinogênio, e o segundo contém hemácias idênticas às do primeiro, porém não sensibilizadas, servindo de controle, para excluir aglutinações inespecíficas que são bastante raras, mas podem ocorrer.

Duas ou três colônias suspeitas com 18 a 24 horas de incubação eram suspensas numa gota de Staphy-Test R sobre uma lâmina de microscópio de maneira uniforme, por uma alça de

platina. Procedia-se da mesma forma com o Staphy-Test C.

Imprimindo-se movimento de rotação à lâmina, e observando-se contra um fundo escuro e boa iluminação, fazia-se a interpretação.

Quando a reação de aglutinação era fortemente positiva, em 5 segundos no Saphy-Test R, e negativa no Staphy-Test C, caracterizava-se a colônia como sendo *S. aureus*, e se dentro de 5 segundos a reação era negativa nos dois reagentes, concluía-se que a colônia suspeita não era de *S. aureus*.

3.5. MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

3.5.1. Método "Sac-culture"

(BERGDOLL & BENNETT, 1984)

O preparo do frasco, para a produção de enterotoxina, foi feito da seguinte maneira: o saco de diálise após lavagem com água, era fechado em uma das extremidades com um barbante e introduzido dentro de um Erlenmeyer de 250 ml, com a outra extremidade ficando exposta de modo a poder introduzir 100 ml de caldo de infusão cérebro e coração (Oxoid -CM 145) em dupla concentração, preparado de acordo com o fa

bricante. Após a introdução do meio dentro do saco de diálise, ele era fechado com barbante e introduzido totalmente no interior do frasco, tamponava-se com algodão e esterilizava-se a 121°C por 15 minutos. Tubos com agar de infusão de cérebro e coração também eram preparados e inclinados.

Uma solução tampão salina fosfatada 0,02M, pH 7,4 foi preparada desta forma:

Solução A (estoque)

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	2,84 g
Cloreto de sódio	9,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Solução B (estoque)

Fosfato monossódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ..	2,76 g
Cloreto de sódio	9,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Ambas as soluções eram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução final era composta por 35,5 ml da solução A e 14,5 ml da solução B, e após a mistura realizada assepticamente, procedia-se à verificação do pH, que, se necessário, era ajustado a 7,4 por adição de solução A ou B, conforme o caso.

Nos tubos com agar de infusão de cérebro e coração inclinados eram inoculados e incubadas todas as culturas de *S. aureus* a serem testadas, a 37°C por 24 horas, sendo 2 tubos de cada isolado. O crescimento era suspenso em

1,0 ml da solução tampão salina fosfatada, e transferido ao fundo do Erlenmeyer de 250 ml com o saco de diálise, perfazendo 2,0 ml de suspensão por cultura, que eram acrescidos de 18,0 ml da solução tampão.

Os frascos com os inóculos foram incubados a 37°C por 24 horas em um "shaker".

Após este período, as suspensões foram recuperadas com pipetas e transferidas para tubos de centrífuga de 50 ml estéreis e centrifugadas a 12.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante era recuperado e transferido para frascos de vidro de 50 ml estéreis com 2 a 3 gotas de Merthiolate 1:5000, o que dependia do volume do sobrenadante, e congelados a -20°C até que se procedesse à detecção das enterotoxinas.

3.6. MÉTODO PARA DETECÇÃO DAS ENTEROTOXINAS

(BERGDOLL & BENNETT, 1984)

O método para a detecção das enterotoxinas utilizado foi o "Optimum Sensitivity Plate", provas de dupla imunodifusão.

As enterotoxinas e as anti-enterotoxinas padrões, utilizadas nestas análises, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll do "Food Research Institute", Universidade de Wisconsin, WI, EUA, e preparadas conforme instruções que as acompanharam (Tabela 1).

Tabela 1. Enterotoxinas e anti-enterotoxinas padrões e respectivas diluições utilizadas.

Reagentes	Tipos	Códigos	Diluições usadas	
Enterotoxinas	A	AT-12	1:12,5	(4,0 µg/ml)
	B	BT-10	1:2,5	(4,0 µg/ml)
	C ₃	C ₃ T-10	1:25	(4,0 µg/ml)
	D	DT-15	1:9	(4,0 µg/ml)
Anti-enterotoxinas	A	AS-15	1:24	(4,0 µg/ml)
	B	BS-12	1:40	(4,0 µg/ml)
	C ₃	C ₃ S-10	1:48	(4,0 µg/ml)
	D	DS-12	1:20	(4,0 µg/ml)

Uma vez prontos os reagentes, o meio agar 1,2% (Difco-0560) preparado com solução tampão salina fosfatada 0,02M, pH 7,4 e Merthiolate 1:10.000, previamente preparada, era derretido e distribuído à razão de 3,0 ml por placa de Petri 12x52mm.

Após a solidificação do agar 1,2%, através do molde (Apêndice 2 - Figura 1), fazia-se o corte dele com os cortadores de rolha, com eliminação do agar excedente. Cada placa recebia no seu fundo, um número para posterior registro.

Assim que a placa estivesse pronta, com uma pipeta de Pasteur, aplicava-se a enterotoxina nos dois orifí-

cios menores, superior e inferior, a anti-enterotoxina no orifício central e as amostras a serem testadas nos orifícios laterais superior esquerdo e direito, e inferior esquerdo e direito.

Por esta técnica, podem-se testar quatro amostras por placa, de cada toxina.

Depois de aplicadas as amostras, a placa de Petri era fechada com a respectiva tampa e colocada dentro de uma caixa plástica, que continha pequenos "beakers" nos seus cantos, cada um com 5,0 ml de água destilada. A caixa plástica era fechada e incubada a 37°C por 24 horas.

Para cada placa foi feito um registro do qual constavam o formato do molde, o número correspondente e tais como o tipo de toxina, as amostras e respectivas posições testadas (Apêndice 4, Figura 3).

Decorrido o período de incubação, o agar era lavado com água destilada, e 2,0 a 3,0 ml de ácido fosfórico 0,1M eram adicionados na superfície do agar.

As placas eram examinadas, depois de dois a três minutos em um contador de colônias "QUEBEC".

Os resultados eram considerados positivos, quando linhas de precipitação eram formadas e se reuniam com a correspondente da enterotoxina. Desta forma, as amostras eram consideradas positivas para a enterotoxina testada naquela placa. O resultado era considerado negativo quando se observava somente a linha de precipitação formada entre a enterotoxina testada e o seu respectivo anti-soro.

Os resultados eram registrados, na forma da linha de precipitação, e analisados posteriormente para identificar as linhagens produtoras quanto ao tipo de enterotoxina. Em casos de dúvida na interpretação, repetia-se a análise.

Em todas as análises, desde a identificação até a detecção das enterotoxinas, linhagens de *S. aureus* fornecidas pela Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP, foram utilizadas como controle (Tabela 2).

Tabela 2. Linhagens de *Staphylococcus aureus* usadas como controle positivo nos testes aplicados. Repiques cedidos gentilmente pela Srta. Marilena Aquino de Muro, pesquisadora da Coleção de Culturas Tropical (FPPT - André Tosello), Campinas, SP.

Linhagem	Produtora de enterotoxina	Origem
FPTP-1294	A	FRI-100A
FTPT-1295	B	FRI-S-6B
FTPT-1297	D	FRI-472-D

Obs.: A cultura de *S. aureus* produtora da enterotoxina C₃ não foi utilizada como controle, por não ser esta linhagem acessível nas coleções de culturas do Brasil.

4. RESULTADOS

A partir de 122 amostras de material, coletado de fossa nasal, realizou-se: 1) isolamento e identificação de *S. aureus*; 2) verificação da capacidade produtora de enterotoxinas estafilocócicas.

De 30 isolados de *S. aureus*, a partir de diversos espécimes clínicos (amostras clínicas), cedidos pelo Centro de Patologia Clínica Preventiva, realizou-se a verificação da capacidade produtora de enterotoxinas estafilocócicas.

Na Tabela 3 encontra-se a distribuição das amostras colhidas de fossa nasal de portadores eventuais, de acordo com os passos da metodologia utilizada nesta dissertação. O uso do meio seletivo para isolamento *Staphylococcus* Nº 110 apresentou um desenvolvimento das amostras colhidas de 100%. Nas culturas desenvolvidas quando da realização da microscopia em esfregaços corados pelo método de Gram, verificou-se que 100% das amostras apresentaram cocos Gram positivos com

Tabela 3. Distribuição das amostras isoladas de portadores eventuais no ano de 1988, examinadas para identificação e caracterização de *S. aureus*.

Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	Isolados de fossa nasal nº	Coco G+		Prova da coagulase		Prova da termo- nuclease		Prova do Staphy-Test		Culturas caracterizadas como <i>S. aureus</i>	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	122	122	100	43	35,2	34	79,1	34	79,1	34	27,9
Negativo	-	-	-	79	64,8	9	20,9	9	20,9	88	72,1
TOTAL	122	122	100	122	100	43	100	43	100	122	100

características de estafilococos. A prova da coagulase apresentou-se positiva para 35,2% (43) das amostras testadas, sendo que entre 9 amostras consideradas coagulase positivas, conforme guia de avaliação desta prova (Apêndice 3, Figura 2), 7 (16,3%) eram 1+ e 2 (4,6%) 2+. As provas da termonuclease e "Staphy-Test" apresentaram uma produtividade de 79,1% (34) para as amostras coagulase positivas as quais correspondiam justamente as amostras coagulase positivas avaliadas como 3+ e 4+ e as culturas caracterizadas como *S. aureus* correspondem a 27,9% (34) do total de amostras analisadas.

Na Tabela 4 observamos que, entre as 34 culturas de *S. aureus* isoladas de portadores eventuais, testadas para a produção de enterotoxinas, 17,6% (6 amostras) foram positivas. Destas, 83,3% (5) eram produtoras da enterotoxina tipo A e 16,7% (1) do tipo D.

Tabela 4. Distribuição das linhagens de *S. aureus* isoladas de portadores eventuais, com relação às suas capacidades produtoras de enterotoxinas estafilocócicas.

<i>S. aureus</i> produtores de enterotoxinas	Amostras isoladas de portadores eventuais									
	Amostras testadas		Enterotoxinas testadas							
			A		B		C ₃		D	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	6	17,6	5	83,3	-	-	-	-	1	16,7
Negativo	28	82,4	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	34	100	5	14,7	0	0	0	0	1	2,9

Na Tabela 5 verificamos que as 30 culturas de *S. aureus* isoladas de materiais clínicos, testados para a produção de enterotoxinas, tiveram uma porcentagem de 53,3% (16 amostras) de positividade, sendo que 43,7% (7) produziram enterotoxina tipo A, 68,7% (11) tipo B e 6,25% (1) tipo C₃. É importante ressaltar que 3 (18,75%) das amostras positivas eram produtoras de enterotoxina de tipos A e B.

Tabela 5. Distribuição das linhagens de *S. aureus* isoladas de espécimes clínicos (amostras clínicas), com relação às suas capacidades produtoras de enterotoxinas estafilocócicas.

S. aureus produtores de enterotoxinas	Amostras de isolados clínicos									
	Amostras testadas		Enterotoxinas testadas							
			A		B		C ₃		D	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	16	53,3	7	43,7	11	68,7	1	6,25	-	-
Negativo	14	46,7	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	30	100	7	23,3	11	36,6	1	3,3	0	0

5. DISCUSSÃO

Em nosso País são mal conhecidos, tanto a estrutura quanto os caracteres epidemiológicos da intoxicação alimentar estafilocócica, dada a falta de dados sobre a ocorrência de surtos dessa doença adequadamente diagnosticados. Isto se deve, em parte, à falta de notificação e, nos casos comunicados, à falta de condições laboratoriais necessárias, para que se possa realizar o diagnóstico completo.

A ausência desses registros contribui, também, para que seja demonstrada a necessidade de criar unidades, que possam oferecer este tipo de serviço especializado.

Nos últimos anos, o desenvolvimento tecnológico, tem dado contribuições significativas para a taxonomia bacteriana, o que é comprovado principalmente pelos trabalhos de BAIRD-PARKER (1974); TATINI et alii (1984) e KLOOS & SCHLEIFER (1986).

As amostras analisadas no presente estudo, colhidas de fossa nasal de portadores eventuais, foram semea-

das no meio seletivo para isolamento *Staphylococcus* Nº 110, e os crescimentos característicos isolados e submetidos as provas de identificação e caracterização para a espécie.

De acordo com WHITE et alii (1988), num estudo comparativo de seis meios seletivos para a enumeração e isolamento de estafilococos, o meio *Staphylococcus* Nº 110, foi o que se apresentou mais conveniente à propositura. Os resultados que obtivemos confirmam a opinião desses autores.

A prova da coagulase em tubo é uma das mais significativas na identificação de espécies de *S. aureus* de acordo com THATCHER & CLARK (1973), embora SPEBER & TATINI (1975) relatem em determinados casos, dificuldades na sua interpretação. LACHICA (1976) recomenda a prova da termonuclease em culturas líquidas para identificação de *S. aureus* em alimentos, por ser de fácil execução e interpretação.

Portanto, a aplicação destas duas provas pode ser realizada na identificação de *S. aureus* em uma sequência, para uma melhor caracterização, e foi o que se realizou no presente estudo. Todas as culturas coagulase positivas, independentemente do grau de coagulação, passaram em seguida, pela determinação da termonuclease.

Apesar do *S. aureus* ser caracterizado com base nestas provas, depois que colônias suspeitas isoladas de vários materiais, são a elas submetidas (ICMSF, 1978; TATINI et alii, 1984), deve-se ter um certo cuidado para que a in-

interpretação não seja errônea, pois pela atual taxonomia dos estafilococos (KLOOS & SCHLEIFER, 1986), duas novas espécies, o *S. intermedius* e o *S. hyicus* subsp *hyicus*, apresentam algumas linhagens que também são positivas para as provas de coagulase e termonuclease, embora a enterotoxigenicidade delas não esteja completamente estabelecida (TATINI et alii, 1984) e as suas ocorrências comuns não sejam as mesmas do *S. aureus*.

Com isso houve uma certa preocupação, no presente estudo, com a caracterização dos *S. aureus* isolados de amostras colhidas de fossa nasal de portadores eventuais, e para ter uma melhor precisão e facilidade na interpretação dos resultados, optou-se por acrescentar uma prova específica: o "Staphy-Test", prova esta de fácil execução, rapidez e alta especificidade.

Portanto, os *S. aureus* isolados são caracterizados como: cocos Gram positivos, coagulase positivos, termonuclease positivos e "Staphy-Test" positivos, sendo que todos os isolados apresentaram positividade de 100% para estas provas.

Os isolados foram, depois de suas caracterizações, submetidos à produção de enterotoxinas pela técnica do "Sac culture" (BERGDOLL & BENNETT, 1984), sendo realizada por diversas vezes, devido ao limite do "shaker" e à medida em que se obtinham os isolados caracterizados. Todas as vezes da aplicação desta técnica, as três culturas (Tabe

la 2) foram testadas em conjunto com as demais amostras, como controle positivo.

De acordo com NOLETO & TIBANA (1987), a enterotoxina do tipo A é a mais comumente relatada na implicação de intoxicações alimentares. Nos Estados Unidos, a enterotoxina tipo A foi identificada em 27 de 29 surtos, enquanto que a tipo B somente em 2 dos 29 surtos relatados por Holmberg e Blake no ano de 1984 (citado por NOLETO & TIBANA, 1987).

ADESIYUN et alii (1986), confirmam a presença de *S. aureus* enterotoxigênio do tipo A, em seu estudo como sendo o tipo mais frequente entre outros determinados. Estes autores em uma amostragem de fossas nasais de trabalhadores em restaurantes, onde 207 isolados foram testados para produção de enterotoxinas, 55 (26,6%) eram isolados enterotoxigênicos e destes, 18 (8,7%), 9 (4,3%), 14 (6,8%), 13 (6,3%) e 9 (4,3%), eram respectivamente tipos A, B, C, D e E, sendo que havia isolados produtores de enterotoxinas AB (1), AC (1), AD (2), BE (1), CD (1), CE (1) e DE (1), o que os levou a concluir que os *S. aureus* enterotoxigênicos tipo A são os de maiores riscos numa intoxicação alimentar naqueles restaurantes. No entanto, segundo estes autores, os resultados diferem dos de Reali, citado por eles, onde em 41 isolados testados somente 4 (9,8%) produziam a enterotoxina tipo A ou em combinação com outras enterotoxinas, e 30 (73,1%) produziam a enterotoxina somente tipo B ou em combinação com outras. Estas diferenças, segundo eles, podem ser explicadas, em parte, pela di-

ferença no tamanho das amostras testadas, localização geográfica e frequência de intercâmbio de estafilococos entre animais e indivíduos humanos.

HIROOKA & MULLER (1982), demonstraram em seu trabalho que os 75 isolados de *S. aureus*, provenientes de alimentos, 32 (42,7%) se mostraram positivos na produção de enterotoxinas tipo A e, segundo eles, os resultados obtidos por diversos autores indicam que os isolados de diferentes fontes variam quanto à produção e os tipos de enterotoxinas produzidas. Eles citam que Delazari e Leitão, em 1976, e Niskanen & Koiranen, em 1977, tiveram em seus trabalhos resultados semelhantes ou superiores com relação às porcentagens de isolados de *S. aureus* de alimentos produtores de enterotoxinas.

Há uma predominância dos isolados de *S. aureus* enterotoxigênicos, em produzir a enterotoxina tipo A, quando estes são testados para tal. CASMAN et alii (1967) as identificaram em 50,8% dos isolados, DELAZARI & LEITÃO (1976), em 49,3%, Niskanen & Koiranen em 1977 (citado por HIROOKA & MULLER, 1982) em 63% das amostras.

No entanto, outros autores relatam uma frequência alta de outros tipos em seus estudos, como IARIA (1978), que encontrou incidência do tipo C maiores em relação a outras, e CASMAN et alii (1967) encontraram uma incidência alta também do tipo D.

Os resultados encontrados neste trabalho, com relação a amostragem de fossa nasal de portadores eventuais, confirmam a predominância de *S. aureus* enterotoxigênico A com 83,3% (5) dos tipos detectados, enquanto o isolado de *S. aureus* enterotoxigênico D alcançou 16,7% (1), quando isolado desta fonte.

Quanto às amostras clínicas, esses isolados (30) tiveram uma porcentagem de 53,3% (16) de produtores de enterotoxinas dos tipos A, B e C₃, sendo 43,7% (8), 68,7% (11) e 6,25% (1), respectivamente, onde 3 isolados produziram dois tipos de enterotoxinas (A e B) simultaneamente.

Esses resultados vêm demonstrar a potencialidade desses isolados em poder proporcionar intoxicação alimentar estafilocócica, além de já estarem ligados a outras patologias, provando serem eles de alto risco no caso de contaminarem alimentos.

NOLETO & TIBANA (1987) relatam que 46% dos indivíduos acometidos pela intoxicação alimentar estafilocócica do tipo B são hospitalizados, enquanto que somente 5% dos acometidos pelo tipo A o são. Com isto, verificamos que os isolados de amostras clínicas, onde predominam os do tipo B, apresentam-se como os de maior perigo, pois os casos de internação por intoxicação alimentar estafilocócica têm maior seriedade, caso contaminem alimentos que facilitem as suas necessidades de desenvolvimento e produção de enterotoxinas e estes sejam ingeridos.

Sabendo-se que as necessidades nutritivas do *S. aureus* são facilmente preenchidas por muitos dos mais variados tipos de alimentos, o presente trabalho se propôs a estudar a ocorrência e distribuição do *S. aureus*, que pode ser relacionado com surtos de intoxicação alimentar, se porventura vierem a contaminar alimentos durante o seu preparo por portadores eventuais, e ainda aqueles portadores de patologias diversas em que ocorrem os *S. aureus*. Portanto, são estas as fontes de contaminação mais comuns, desde que práticas sanitárias não sejam empregadas, quer por descuido ou por desinformação. De qualquer maneira, os riscos estão presentes e podem ser confirmados pelos resultados apresentados por este estudo.

Pelo que foi exposto, pode-se salientar que medidas de profilaxia da intoxicação alimentar estafilocócica se fazem necessárias, aí incluída a educação sanitária dos que manipulam e comercializam alimentos, além do uso das metodologias mais adequadas na conservação dos diversos alimentos, já que um grande número de surtos de intoxicação alimentar estão relacionados com a conservação inadequada.

Outros estudos visando principalmente aos estabelecimentos tais como indústrias alimentícias, restaurantes de qualquer tipo e ainda estabelecimentos congêneres, devem ser realizados para obter dados sobre o potencial de veiculação de *S. aureus* enterotoxigênicos pelos seus funcionários, que manipulam alimentos, assim como de outros agentes

de toxinfecções alimentares, para se ter um melhor conhecimento da estrutura epidemiológica desse grupo de doenças, e com isso contribuir para a orientação mais adequada das medidas profiláticas.

6. CONCLUSÕES

1. Das 122 amostras examinadas de fossa nasal de portadores eventuais, foram encontrados cocos Gram positivos com características de estafilococos e coagulase positivos em 35,2% (43).

2. Dos 43 isolados coagulase positivos, foram encontrados 34 (79,1%) que também eram termonuclease positivos.

3. Dos 43 isolados coagulase positivos, foram encontrados 34 (79,1%) que também eram "Staphy Test" positivos.

4. Tendo em vista a total concordância entre os testes da termonuclease e do "Staphy Test", conclui-se que é preferível aplicar apenas o "Staphy Test", por ser mais rápido e de realização mais simples. Com efeito, os testes da coagulase e da termonuclease demoram cerca de 24 horas para dar resultados, ao passo que o "Staphy Test" se realiza em poucos minutos.

5. Das 34 culturas de *S. aureus* provenientes de amostras de fossa nasal, 6 (17,6%) eram produtoras de enterotoxinas, sendo 5 do tipo A e uma do tipo D.

6. Das 30 culturas de *S. aureus* provenientes de isolados clínicos, 16 (53,3%) eram produtoras de enterotoxinas, das quais 4 relativas ao tipo A, 8, ao tipo B, 3 produtoras dos tipos A e B simultaneamente, e uma do tipo C₃.

7. A presença de *S. aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de portadores eventuais de Piracicaba, demonstra a necessidade de medidas sanitárias adequadas para evitar a contaminação de alimentos por linhagens estafilocócicas capazes de provocar surtos de intoxicação alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESIYUN, A.A.; RAJI, I.; YOBÉ, V. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* from anterior nares of dining hall workers. J. Food Protec., Ames, 49(12): 955-957, 1986.
- ANGELOTTI, R.; FOTER, M.J.; LEWIS, K.H. Time - temperature effects on *Salmonellae* and staphylococci in foods. Am. J. Pub. Health., Washington, 51(1): 76-88, 1961.
- AVENA, R.M. & BERGDOLL, M.S. Purification and some physico-chemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. Biochemistry, Easton, 6(5): 1474 - 80, 1967.
- BAIRD-PARKER, A.C. Genus II *Staphylococcus*. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., ed. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. cap. 14, p.483-89.
- BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E.; AMOS, W.T. Influence of gel depth on resolution of staphylococcal enterotoxin - anti-enterotoxin complexes. Bact. Proceed., Baltimore, 70:6, 1970.
- BERGDOLL, M.S. The enterotoxins. In: COHEN, J.O. ed. The staphylococci. New York, Wiley Interscience, 1972. p.301-331.

- BERGDOLL, M.S. Curso de enterotoxinas estafilocócicas: importância e detecção em alimentos. Fund. Trop. de Pesq. e Tecnol. André Tosello, Campinas, 1988. 78p.
- BERGDOLL, M.S. & BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxins. In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2th. ed., Washington, American Pub. Health. Assoc., 1984. cap. 34, p.428-57.
- BERGDOLL, M.S.; SURGALLA, M.J.; DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing. J. Immunol., Baltimore, 83: 334-38, 1959.
- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. J. Bacteriol., Baltimore, 90(5): 1481-85, 1965.
- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K. F. Identification of enterotoxin E. Infect. Immun., Washington, 4(5): 593-95, 1971.
- BORJA, C.R. & BERGDOLL, M.S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. Biochemistry, Easton, 6(5): 1467 -73, 1967.
- CASMAN, E.P. Serologic studies of staphylococcal enterotoxin. Pub. Health Rep., Washington, 73(7): 599-609, 1958.
- CASMAN, E.P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., Baltimore, 79(6): 849-79, 1960.
- CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. J. Bacteriol., Baltimore, 86(1): 18-23, 1963.

- CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol., Baltimore, 13 (2): 181-9, 1965.
- CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S.; ROBBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., Baltimore, 85 (3): 715-6, 1963.
- CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E.; ISSA, J. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J. Bacteriol., Baltimore, 94(6): 1875-82, 1967.
- CHU, F.S.; THADHANI, K.; SCHANTZ, E.J.; BERGDOLL, M.S. Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry, Easton, 5(10): 3281-9, 1966.
- CLIVER, D.O. Viral infections. In: REIMANN, H. ed. Food-borne infections and intoxications. New York, Academic Press, 1969. p.73-113.
- COLLINS, W.S.; METZGER, J.F.; JOHNSON, A.D. A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. J. Immunol., Baltimore, 108(3): 852-6, 1972.
- COLLINS, W.S.; JOHNSON, A.D.; METZGER, J.F.; BENNETT, R. W. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., Baltimore, 25(5): 774 - 7, 1973.
- DACK, G.M. Food Poisoning. 3th. ed. Chicago, The University of Chicago Press, 1962. p.109-158.

- DAVISON, E.; DACK, G.M.; CARY, W.E. Attempts to assay the enterotoxin substance produced by staphylococci by parenteral injection of monkeys and kittens. J. Infect. Disease, Chicago, 62: 219-23, 1938.
- DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em macarrão. Col. Inst. Tecnol. Alim., Campinas, 7(2): 485-97, 1976.
- DENNY, C.B.; TAN, P.L.; BOHRER, C.W. Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. J. Food Scienc., Ames, 31(5): 762-7, 1966.
- DIFCO LABORATORIES, Detroit. Manual Difco. 10^a ed. Michigan, USA, 1984. 1166p.
- DOLMAN, C.E. & WILSON, R.J. Experiments with staphylococcal enterotoxin. J. Immunol., Baltimore, 35: 13-30, 1938.
- DOLMAN, C.E. & WILSON, R.J. The kitten test for *Staphylococcus* enterotoxin. Canad. Publ. Health. J., Toronto, 31: 68-71, 1940.
- DOLMAN, C.E.; WILSON, R.J.; COCKCROFT, W.H. A new method of detecting *Staphylococcus* enterotoxin. Canad. Publ. Health. J. Toronto, 27: 489-93, 1936.
- DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A.; LEWIS, K.H. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. Appl. Microbiol., Baltimore, 15(6): 1382-7, 1967.
- EIROA, M.N.U. O controle da qualidade microbiológica dos alimentos. Bol. Inst. Tecn. Alim., Campinas, 49: 1-32, 1977.
- FRANCO, B.D.G. de M. & NIELSEN, E.M.F. Avaliação de um teste rápido de aglutinação em lâmina para identificação de culturas de *S. aureus* isoladas de alimentos. Rev. Microbiol., São Paulo, 19(1): 27-28, 1988.

- FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M.; SHIMOKOMAKI, M.; AZEVEDO, C.H.M. Condições higiênico-sanitárias do charque comercializado em São Paulo. Rev. Microbiol., São Paulo, 18(1): 98-102, 1987.
- FRAZIER, W.C. Microbiologia de los alimentos. 2ª ed., Zaragoza, Ed. Acribia, 1972. p.430-5.
- FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. Food Microbiology. 3th. ed. New York, McGraw Hill Book Company, 1978. 540p.
- FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R.F.; BERGDOLL, M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 44(6): 1349-1355, 1982.
- GENIGEORGIS, C. & SADLER, W.W. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. J. Bacteriol., Baltimore, 92(5): 1383-7, 1966.
- GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning and botulism. Postgrad Med. J., London, 50: 603-11, 1974.
- HALL, H.E.; ANGELOTTI, R.; LEWIS, K.H. Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffusion methods. Public Health Rep., Washington, 78(12): 1089-98, 1963.
- HALL, H.E.; ANGELOTTI, R.; LEWIS, K.H. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Health Lab. Sci., 2(3): 179-91, 1965.
- HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. Acta Path. Microb. Scand, Copenhagen, 63: 299-305, 1965.

- HIROOKA, E.Y. & MÜLLER, E.E. Isolamento, caracterização e enterotoxigenicidade de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. Cienc. Tecnol. Alim., Campinas, 2(2): 123-33, 1982.
- HIROOKA, E.Y.; MULLER, E.E.; SANTO, A.E. Bacterimetria de *S. aureus* em produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. Cienc. Tecnol. Alim., Campinas, 2(2): 111-22, 1982.
- HUANG, L.Y.; SHIHT, T.; BORJA, C.R.; AVENA, R.M.; BERGDOLL, M.S. Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin C. Biochemistry, Easton, 6(5): 1480-4, 1967.
- IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* em doces vendidos em padaria e confeitarias do município de São Paulo. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir de cepas isoladas (1975-1976). São Paulo, 1978. 69p. (Livre-Docência - Inst. Cienc. Biomed./USP).
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF), Microorganisms in food. 2th. ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. v.1., 434p.
- JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. Appl. Microbiol., Baltimore, 19(4): 698-9, 1970.
- JAY, J.M. Microbiologia moderna de los alimentos, Zaragoza, Ed. Acribia, 1973. p.190-209.
- JENNINGS, W.E. Food borne illness. In: LIBBY, J.A., ed. Meat hygiene, 4th. ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1975. p.261-95.

- JOHNSON, H.J.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P.E.; PELLER, J.T. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. Appl. Microbiol., Baltimore, 22(5): 837-41, 1971.
- KAUFFMAN, P.E. Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxin A. J. Ass. Off. Anal. Chem., Wash., 63(5): 1138-43, 1980.
- KLAPLAN, M.M.; ABDUSSALAM, M. & BIJLENGA, G. Diseases transmitted through milk. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Milk Hygiene: Hygiene in milk production, processing and distribution. Geneve, 1962. (Monograph series, nº 48). p.11-74.
- KLOOS, W.E. & SMITH, P.B. Aerobic bacteria. In: LENNETTE, E.H. Coord. Manual of clinical microbiology. 3th. ed., Washington, American Society for Microbiology, 1980. p.83-88.
- KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Genus II *Staphylococcus*. In: SNEATH, P.H.A., ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. V.2, cap. 12, p.1013-135.
- KUO, J.K.S. & SILVERMAN, G.J. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. J. Food Protec., Washington, 43(5): 404-407, 1980.
- LACHICA, R.V.F. Simplified thermonuclease test for rapid identification of *S. aureus* recovered on agar media. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 32(4): 633-634, 1976.
- LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I.; MAZZONI, H. Microbiologia de alimentos desidratados. Col. do Inst. de Tecnol. de Alim., Campinas, 5: 223-41, 1973.

- MORSE, S.A. & MAH, R.A. Microtiter haemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., Baltimore, 15(1): 58-61, 1967.
- NOLETO, A.L.S. & TIBANA, A. Outbreak of staphylococcal enterotoxin B food poisoning. Rev. Microbiol., São Paulo, 18(2): 144-45, 1987.
- NOTERMANS, S.; VERJANS, H.L.; BOL, J.; SCHOTHORST, M. van. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B. Health Lab. Scien., 15(1): 28-31, 1978.
- OXOID LIMITED, Basingstoke. The oxoid manual of culture media, ingredients and other laboratory services. 3^a ed., Hampshire, UK, 1976. p.252-53.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, McGraw Hill do Brasil, 1981. v.2, cap. 29, p.710-13.
- REIMANN, H. Curso de intoxicação e infecção alimentar. Fund. Cent. Trop. Pesq. Tecn. Alim., Campinas, 1972. 217p.
- REISER, R.; CONAWAY, D.; BERGDOLL, M.S. Detection of staphylococcal enterotoxin in foods. Appl. Microbiol., Baltimore, 27(1): 83-85, 1974.
- ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxinicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol., Baltimore, 28(6): 946-50, 1974.
- SAUNDERS, G.C. & BARTLETT, M.L. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for detection of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 34(5): 518-22, 1977.

- SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERY, D.A.; BERGDOLL, M.S. Purification of staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, Easton, 4(6): 1011-6, 1965.
- SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.G.; WOODBURN, M.J.; LYNCH, J. M.; JACOBY, H.M.; SILVERMAN, S.J.; GORMAN, J.C.; SPERO, L. Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry, Easton, 11(3): 360-6, 1972.
- SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R.; HOWARD, M. Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods. Appl. Microbiol., Baltimore, 16(7): 1019-23, 1968.
- SIMKOVICOVA, M. & GILBERT, R.J. Serological detection of enterotoxin from food poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol., Edimburgh, 4: 19-30, 1971.
- SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2a. ed, Washington, American Public. Health Association, 1984. 914p.
- SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., Baltimore, 29(4): 502-5, 1975.
- STIFFLER-ROSENBERG, G. & FEY, H. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol., Washington, 8(5): 473-9, 1978.
- SURGALLA, M.J. A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined mediums. J. Infect. Disease, Chicago, 81(2): 97-111, 1947.

- SURGALLA, M.J. & HITE, K.E. A study of enterotoxin and alpha and beta hemolysin production by certain *Staphylococcus* cultures. J. Infect. Disease, Chicago, 76: 78-82, 1945.
- SURGALLA, M.J.; BERGDOLL, M.S.; DACK, G.M. Some observation on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. J. Lab. Clin. Med., St.Louis, 41: 782-88, 1953.
- SURGALLA, M.J.; BERGDOLL, M.S.; DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin: neutralization by rabbit antiserum. J. Immunol., Baltimore, 72(5): 398-403, 1954.
- TATINI, S.R.; HOOVER, D.G.; LACHICA, V.F. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2th. ed., Washington, American Public. Health Association, 1984. Cap. 33, p.411-27.
- THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Analisis microbiologica de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1973. 271p.
- WEISER, H.H.; MOUNTNEY, G.J.; GOULD, W.A. Practical Food. Microbiology and Technology. 2th. ed. Westport, The AVI Publishing, Company Inc., 1971. Cap. 20, p.310-311.
- WHITE, D.G.; MATOS, J.S.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B. E. A comparison of six selective media for the enumeration and isolation of staphylococci. J. Food. Prod., Ames, 51(9): 685-690, 1988.
- WILSON, G.S. & MILES, A.A. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 3th. ed., London, Edward Arnold & Co. Ltd., 1948. v.1, p.607-622.

A P Ê N D I C E

APÊNDICE 1

Staphylococcus Nº 110 (OXOID, 1976)

Fórmula

Extrato de levedura	2,5 g/L
Tryptone	10,0 g/L
Lactose	2,0 g/L
Manitol	10,0 g/L
Cloreto de sódio	75,0 g/L
K ₂ HPO ₄	5,0 g/L
Gelatina	30,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Agar Nutriente (DIFCO, 1984)

Fórmula

Extrato de carne	3,0 g/L
Peptona	5,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Caldo Infusão de Cérebro-Coração (ICMSF, 1978)

Fórmula

Infusão de cérebro de bezerro	200 ml
Infusão de coração bo <u>v</u> ino	250 ml
Peptona	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
NaHPO ₄	2,5g
Glucose	2,0g
H ₂ O dest.	550 ml

Agar Toluidina Azul/DNA (ICMSF, 1978)

Fórmula

Ácido desoxiribonuclei <u>c</u> o	0,3g
Cloreto de cálcio (Ani <u>d</u> ro)	0,0011g
Cloreto de sódio	10,0g
Toluidina azul 0 (sol. aquosa 1% w/v)	9,2ml
Tris (Hidroximetil)ami <u>n</u> ometano	6,1g
Agar	10,0g
H ₂ O dest.	1000 ml

APÊNDICE 2

Figura 1. Molde para servir como guia, no corte do agar das placas para a realização do "Optimum Sensitivity Plate", recomendado por BERGDOLL & BENNETT (1984).

APÊNDICE 3

negativo formação de fibrina não é evidente

1+ positivo pequenos coágulos desorganizados

2+ positivo pequeno coágulo organizado

3+ positivo coágulo grande e organizado

4+ positivo conteúdo total do tubo é coagulado e não se desprende quando o tubo é invertido

Figura 2. Guia para avaliação da reação do teste de coagula-se (Adaptado de TATINI et alii (1984)).

APÊNDICE 4

N.º =

N.º =

N.º =

N.º =

Figura 3. Folha para registro de análise de enterotoxinas.