**OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E PRODUÇÃO DE
ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS ISOLADAS A PARTIR
DE LEITE CRU, LEITE PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO
"MINAS FRESCAL", COMERCIALIZADOS EM PIRACICABA -
S.P.**

HELIANA DE AZEVEDO GOMES
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO

**Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1994**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

Gomes, Heliana de Azevedo
6633o Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de
enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite
cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "minas fres
cal", comercializados em Piracicaba - S.P. Piracic
ba, 1994.
124p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Laticínio - Contaminação - Piracicaba, SP 2. Lei
te - Microbiologia 3. Queijo de Minas - Microbiologia
4. Toxina bacteriana I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 637.1277

**OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E PRODUÇÃO DE
ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS ISOLADAS A PARTIR
DE LEITE CRU, LEITE PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO
"MINAS FRESCAL", COMERCIALIZADOS EM PIRACICABA -
S.P.**

HELIANA DE AZEVEDO GOMES

Aprovada em: 20.09.1994

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira

ESALQ/USP

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO
Orientador

A meus pais, Octávio e Josefa
e ao meu marido Luis, por
mais esta conquista

DEDICO.

A meus irmãos, Luiz Otávio e
Sandra, sempre presentes em
minha formação

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

- Aos professores Dr. Rodolpho de Camargo ("in memorian") e Dr. Cláudio Rosa Gallo pela amizade, incentivo, apoio e orientação para a elaboração deste trabalho;
- Ao professor Paulo Vertoni pelo apoio e esclarecimentos nos testes de produção e detecção de enterotoxinas estafilocócicas;
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelos recursos oferecidos;
- À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido e à CAPES pela bolsa concedida para a realização deste curso;
- Ao Dr. Merlin S. Bergdoll, da Universidade de Madison, E.U.A., pelas toxinas e anti-enterotoxinas estafilocócicas doadas para a realização deste trabalho;

- À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em especial aos professores Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, Dra. Rhame Nelly Neder e Dra. Aline A. Pizzirani Kleiner (Departamento de Genética) e aos funcionários Denise de A. L. Baptista, Rosalina de F. Ocangne, Cecília H. Nogueira, Sandra de Marchi Vello e Hilcias Arruda Nicolau;
- Ao Luis Roberto Martin e Valmir E. Alcarde, pela colaboração na liofilização das linhagens bacterianas identificadas;
- À meus pais e ao Luis G. Gomes pelo estímulo, companheirismo, dedicação e amor;
- Aos colegas do curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial à Vânia Travaglini Casarotti e à Célia Regina de Ávila, pela amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

pág.

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	07
3. REVISÃO DA LITERATURA	08
3.1. Leite e derivados como substrato para crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	08
3.2. Classificação e características gerais de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.3. Epidemiologia e patogenia	33
3.4. Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite e derivados	40

4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. Amostragem	57
4.2. Detecção, isolamento e identificação	58
4.2.1. Testes bioquímicos	59
4.2.1.1 Teste da catalase	59
4.2.1.2. Teste da digestão da gelatina	59
4.2.1.3. Teste da digestão da lecitina	60
4.2.1.4. Teste de hemólise	60
4.2.1.5. Teste de oxidação e fermentação da glicose e do manitol	61
4.2.1.6. Teste de coagulase	61
4.2.1.7. Teste de termonuclease	62
4.2.1.8. Prova do fator "clumping"	63
4.3. Manutenção das linhagens de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> isoladas	64
4.4. Produção de enterotoxinas estafilocócicas	64
4.5. Detecção e caracterização das enterotoxinas	66
4.6. Acidez titulável	69
4.7. Determinação do pH	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Desenho esquemático de molde utilizado para fazer perfurações no ágar em placa de sensibilidade ótima. pág.68

- FIGURA 2. Desenho esquemático da disposição da enterotoxina e anti-enterotoxina padrão, bem como das amostras testadas quanto à produção de enterotoxinas estafilocócicas, em placa de sensibilidade ótima. pág.70

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Enterotoxinas e anti-enterotoxinas
padrões e respectivas diluições empregadas
nos experimentos. pág.67

- TABELA 2. Números de *Staphylococcus aureus* presentes
em diferentes produtos lácteos coletados
em Piracicaba, durante o período de
dezembro de 1991 a março de 1992. pág.77

- TABELA 3. Valores de pH e acidez titulável obtidos
a partir das amostras de leite cru, leite
pasteurizado tipo C e queijo "Minas
Frescal", utilizadas nas análises de
ocorrência de *Staphylococcus aureus*, no
período de dezembro de 1991 a março de
1992. pág.84

- TABELA 4. Distribuição da frequência de isolamento
das linhagens de *Staphylococcus aureus*,
nas amostras de leite cru e de queijo "Minas
Frescal", coletadas em Piracicaba, no
período de dezembro de 1991 a março
de 1992. pág.87

- TABELA 5. Distribuição das linhagens bacterianas isoladas a partir dos diferentes produtos lácteos analisados, segundo a positividade para os testes realizados durante o período de novembro de 1991 a março de 1992.

pág.89

- TABELA 6. Resultados dos testes de identificação apresentados por diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados a partir de leite cru e de queijo "Minas Frescal", durante o período de dezembro de 1991 a março de 1992.

pág.92

OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E PRODUÇÃO DE
ENTEROTOXINAS POR LINHAGENS ISOLADAS A PARTIR DE LEITE CRU,
LEITE PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO "MINAS FRESCAL",
COMERCIALIZADOS EM PIRACICABA - S.P.

Autora: HELIANA DE AZEVEDO GOMES

Orientador: PROF. DR. CLÁUDIO ROSA GALLO

RESUMO

Este trabalho foi realizado para detectar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", comercializados em Piracicaba, bem como detectar a capacidade enterotoxigênica de linhagens isoladas destes produtos.

S. aureus foi isolado plaqueando-se amostras de leite e queijo em meio ágar Baird-Parker. Colônias típicas foram submetidas a testes bioquímicos para identificação.

Os resultados deste estudo mostraram que de 56 amostras de produtos lácteos examinadas, 15 (26,32%) apresentaram-se contaminadas por *S. aureus*.

Em relação ao leite cru, observou-se que das 19 amostras analisadas 11 (57,89%) estavam contaminadas por *S. aureus*, sendo que as contagens variaram de $1,20.10^3$ - $7,40.10^5$ UFC/ml, com média de $7,75.10^4$ UFC/ml. *S. aureus* não

esteve presente em nenhuma das 19 amostras de leite pasteurizado tipo C examinadas.

Quanto ao queijo "Minas Frescal" os resultados mostraram que *S. aureus* esteve presente em 4 (22,22%) das 18 amostras analisadas e as contagens variaram de $4,70.10^4$ - $1,38.10^6$ UFC/g, com média de $4,32.10^5$ UFC/g.

Nenhuma das 23 linhagens isoladas e identificadas como *S. aureus*, a partir de leite cru e queijo "Minas Frescal", produziram quaisquer das enterotoxinas analisadas, ou seja, dos tipos A, B, C₂ e D.

Tanto amostras de queijo "Minas Frescal" quanto de leite cru apresentaram contagens em níveis capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas detectáveis em alimentos, constituindo risco potencial à saúde pública.

Todas as amostras de queijo "Minas Frescal" contaminadas por *S. aureus* apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos legais brasileiros, indicando que elas são impróprias para o consumo humano e, portanto, deve ser exercido um maior controle, para se evitar a comercialização e o consumo deste produto.

OCCURRENCE OF *Staphylococcus aureus* AND ENTEROTOXINS
PRODUCTION BY ISOLATED STRAINS FROM RAW MILK, PASTEURIZED
MILK TYPE C AND "MINAS FRESCAL" CHEESE, COMMERCIALIZED IN
PIRACICABA - S.P.

Author: HELIANA DE AZEVEDO GOMES

Adviser: PROF. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO

SUMMARY

This work was undertaken to detect the *S. aureus* occurrence in raw milk, pasteurized milk type C and "Minas Frescal" cheese marketed in Piracicaba, as well as to detect the enterotoxigenic capacity of the isolated strains from these products.

S. aureus were isolated by plating milk and cheese samples on Baird-Parker Ágar medium. Typical colonies were submitted to biochemical tests, for identification.

The results of this work pointed out that from 56 samples of milk and dairy products examined, 15 (26,32%) presented contaminated by *S. aureus*.

For raw milk, from the 19 samples analysed, 11 (57,89%) were contaminated by *S. aureus*, where the counts ranged from $1,20 \cdot 10^3$ - $7,40 \cdot 10^5$ c.f.u./ml, with an average of

7,75.10⁴ c.f.u./ml . *S. aureus* wasn't present in any of the 19 pasteurized milk type C samples examined.

For "Minas Frescal" cheese the results pointed out that the *S. aureus* was present in 4(22,22%) out of the 18 samples analysed and the counts ranged from 4,70.10⁴ - 1,38.10⁶ c.f.u./g, with an average of 4,32.10⁵ c.f.u./g.

No one of all 23 strains isolated and identified as *S. aureus* from raw milk and "Minas Frescal" cheese produced any of the A, B, C₂ and D enterotoxins types analysed.

Both "Minas Frescal" cheese and raw milk showed counts at levels able to produce detectable staphylococcal enterotoxin in foods, so being potential risk to public health.

All "Minas Frescal" cheese samples contaminated by *S. aureus* were out of the legal brasilian microbiological standards, indicating that they are inappropriate for human consumption, so, a better control must be exercised to avoid the consumption and marketing of this product.

1. INTRODUÇÃO

O leite bovino e seus derivados têm importância fundamental na alimentação diária do Homem, já que se constituem em alimentos de grande valor nutritivo e energético, devido a sua composição em carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas.

Excetuando-se o leite da espécie humana, ingerido naturalmente pelos lactentes, utiliza-se primordialmente como alimento a secreção das glândulas mamárias da vaca e, em certas regiões do mundo, da ovelha, da cabra e do búfalo fêmea.

Além do leite bovino, grande parte de seus derivados apresenta características nutricionais e físico-químicas que os tornam excelente substrato para a maioria dos microrganismos, inclusive os patogênicos. Tais microrganismos podem ser veiculados pelo leite e derivados, ou neles se multiplicarem, produzindo substâncias tóxicas.

Os microrganismos são os principais responsáveis pela transmissão de doenças a partir do leite e derivados e pela deterioração da qualidade destes alimentos. Sendo assim, os processos de conservação e tratamento visam, de maneira direta ou indireta, combater estes agentes. O principal

método de conservação do leite e derivados utiliza a redução da temperatura, através de resfriamento e refrigeração, enquanto o tratamento mais amplamente utilizado é a pasteurização.

Dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite, pode-se destacar o *Staphylococcus aureus*, microrganismo capaz de crescer em ampla faixa de condições ambientais, podendo provocar doenças no homem e nos animais e que, através dos alimentos, pode ser responsabilizado por casos de intoxicação alimentar.

Staphylococcus aureus produz inúmeras enzimas, tais como a coagulase e termonuclease, as quais vêm sendo utilizadas como características importantes na sua identificação. Além disso, *Staphylococcus aureus* tem se mostrado mais resistente a baixos valores de atividade de água, quando comparado a outras bactérias associadas a alimentos e pode crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

As linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de intoxicação alimentar, podem produzir as enterotoxinas dos tipos A, B, C₁, C₂, C₃, D e E, isoladamente, ou em combinação de dois ou mais tipos concomitantemente. A enterotoxina estafilocócica A é a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Essa doença é causada pelo consumo de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas e, embora seja comum no

mundo inteiro, em países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil, não se conhece sua freqüência real, pois a maioria dos casos não são notificados. Os principais sintomas da doença, vômito e diarréia, são de curta duração e, em grande parte dos casos, os indivíduos acometidos pela doença não recebem cuidados médicos.

Recentemente, alguns estudos pioneiros realizados em Belo Horizonte e Ouro Preto, registraram surtos de intoxicação alimentar estafilocócica devido ao consumo de queijo "Minas" e queijo "Minas Frescal", contribuindo significativamente para alertar que, em nosso meio, os produtos lácteos são importantes veículos do *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas.

Vários fatores propiciam condições favoráveis para a contaminação do leite cru e derivados por *Staphylococcus aureus*, dentre os quais destacam-se, principalmente, a elevada prevalência deste microrganismo como agente etiológico da mastite bovina, sua ubiquidade na natureza e o baixo nível sócio-econômico dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos do microrganismo e possuidores de maus hábitos higiênicos. Uma vez presente no leite e encontrando condições que propiciem a sua multiplicação, o *Staphylococcus aureus* pode, em algumas horas, atingir números elevados e, dependendo da linhagem, poderá haver produção de enterotoxinas.

Embora o processo de pasteurização assegure a destruição das linhagens de *Staphylococcus aureus*

originalmente presentes no leite cru, a enterotoxina pré-formada, responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica, é termoe estável e poderá permanecer no leite pasteurizado e seus derivados.

Além disso, o *Staphylococcus aureus* poderá estar envolvido em surtos de intoxicação alimentar provocados por leite pasteurizado, se houver alguma falha durante o processamento e/ou contaminação pós-processamento. No caso de contaminação do leite pasteurizado por *Staphylococcus aureus*, este poderá ser considerado mais adequado ao crescimento e produção de enterotoxina do que o leite cru, devido à redução da microflora competidora (TATINI et al, 1971 e MARSHALL, 1992).

Falhas ocorridas durante a ordenha e processamento, aliadas a elevadas temperaturas de conservação a nível de comércio varejista, são fatores que têm contribuído para a comercialização de produtos lácteos com características microbiológicas fora dos padrões regulamentares.

No Brasil, é comum a comercialização de leite cru e queijo "Minas Frescal" produzido a partir de leite não pasteurizado, ainda que tais práticas sejam proibidas pela legislação vigente.

O leite pasteurizado tipo C, que apresenta teor de gordura 3,2% m/v, também é um produto amplamente consumido, em parte, devido a seu preço mais acessível,

quando comparado a outros tipos de leite pasteurizado disponíveis no mercado.

É importante salientar que, comumente, os pequenos produtores de leite são os maiores responsáveis pela comercialização do leite cru a nível de varejo, produção de leite tipo C "in natura", bem como pela produção e comercialização de queijo "Minas Frescal", produzido a partir de leite não pasteurizado.

Em geral, nessas propriedades, o leite é ordenhado manualmente, propiciando condições para contaminação através do solo, fezes e próprios trabalhadores. Na maioria dos casos, o leite é obtido de animais sem controle veterinário, possibilitando que o leite de vacas mastíticas, nas formas clínica e sub-clínica, possa ser misturado ao leite de vacas sadias. Além disso, o leite cru é frequentemente mantido à temperatura ambiente por algum período de tempo antes da comercialização ou processamento e, portanto, em condições não adequadas de conservação. Sendo assim, é grande a possibilidade de ocorrência de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas nestes produtos lácteos, representando risco potencial à saúde pública.

Além dos problemas de saúde pública que os surtos de intoxicação alimentar estafilocócica podem acarretar, há também o impacto econômico, devido à despesas médicas e perda de produtividade do indivíduo acometido pela doença.

Tendo em vista as diferentes vias que podem levar à contaminação do leite e derivados por *Staphylococcus aureus*, torna-se de crucial importância a análise microbiológica de tais produtos no mercado varejista, a fim de se questionar a adequação do processo de obtenção, pasteurização, distribuição e comercialização para as atuais condições higiênico-sanitárias que prevalecem nas bacias leiteiras do país.

2. OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de verificar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", comercializados em Piracicaba, bem como detectar a capacidade enterotoxigênica de linhagens isoladas a partir dos referidos produtos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Leite e derivados como substrato para crescimento de *Staphylococcus aureus*

O leite de origem bovina é um dos alimentos mais completos para o Homem, devido à sua composição em substâncias nutritivas e energéticas facilmente assimiláveis (FROEDER et al, 1985). Constitui-se numa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, na qual encontramos água, gordura, carboidratos, principalmente a lactose, proteínas, sais minerais, vitaminas e alguns gases. A digestibilidade desses componentes é elevada, sendo de 97% para as proteínas, 95% para as gorduras e de 98% para a lactose (OLIVEIRA & CARUSO, 1986).

Sendo um alimento de alto valor nutritivo, o leite também constitui-se em excelente meio de cultura para os microrganismos, principalmente as bactérias. Muitas das bactérias encontradas no leite e derivados são de pequena importância para a indústria de laticínios e para a saúde pública. Outras, porém, são agentes de deterioração, capazes de provocar alterações no sabor e/ou aroma e/ou características físicas do leite. Outras ainda, são

patogênicas, ou seja, capazes de causar distúrbios de ordem fisiológica através de infecção ou intoxicação de um hospedeiro susceptível, constituindo-se no grupo de microrganismos mais importante no que concerne à saúde pública (GALLO,1978; CARUSO & OLIVEIRA, 1982 e VASAVADA, 1988).

A presença de bactérias patogênicas no leite têm sido motivo de preocupação para a saúde pública desde os primórdios da indústria de laticínios (VASAVADA, 1988).

De uma maneira geral, o úbere de vacas sadias pode ser considerado isento de microrganismos, mas já no canal lactífero pode ocorrer contaminação com as primeiras bactérias introduzidas a partir do meio externo. Os micrococos, estafilococos, estreptococos e bacilos predominam entre a flora microbiana da teta e do úbere. Entretanto, durante e após a ordenha, o leite é passível de ser contaminado também com microrganismos provenientes de zonas externas ao úbere, tais como: manipuladores do alimento, animal doente, dejetos, solo, água, ar, baldes de ordenha ou ordenhadeiras mecânicas, coadores, canalizações, reservatórios, refrigeradores e outros equipamentos. A partir destas diferentes fontes de contaminação, microrganismos patogênicos poderão atingir o leite em quantidade suficiente para transmitir inúmeras doenças, a exemplo da febre tifóide, difteria, shigelose, brucelose, tuberculose, intoxicação estafilocócica, hepatite A e poliomielite (BRYAN, 1983 e VASAVADA, 1988).

Os tipos e números de microrganismos que atingem o leite dependem, entre outros fatores, das condições de saúde do animal e do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, bem como do estado de sanitização dos equipamentos utilizados durante a ordenha e da conservação e tratamento do leite (CARUSO & OLIVEIRA, 1982).

A baixa qualidade do leite cru é um problema muito comum no Brasil e isto pode ser explicado, levando-se em conta fatores como as condições climáticas, que são favoráveis ao desenvolvimento da maioria dos microrganismos relacionados ao leite, práticas de produção e manuseio do leite a nível de fazenda, localização geográfica e temperatura do leite durante o transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção ou usina (BUSANI, 1989).

Grandes prejuízos são causados à qualidade do leite cru e derivados devido a mastite, que é a inflamação da glândula mamária, geralmente causada por agente infeccioso, e que se caracteriza por alterações físicas, químicas e, muitas vezes, bacteriológicas do leite (BLOOD et al, 1983). Inúmeros estudos têm revelado que a incidência de mastite clínica e sub-clínica causada por *Staphylococcus aureus* é bastante comum, de modo que o leite é facilmente contaminado por este patógeno. Em casos de infecção mastítica, o *Staphylococcus aureus* tem sido apontado como uma das espécies importantes em termos de saúde pública. Isto porque certas linhagens de *Staphylococcus aureus* são produtoras de

enterotoxinas termoestáveis, responsáveis por intoxicações (CARUSO & OLIVEIRA, 1982).

Não basta cercar a ordenha dos cuidados indispensáveis para se ter leite de baixa contagem microbiana; faz-se necessário manter esta qualidade até o consumo. Isto dependerá da manutenção do produto cru a baixas temperaturas desde o momento da ordenha até a chegada à usina de beneficiamento e, posteriormente, do processamento adequado do leite e derivados, onde o calor e, novamente o frio, serão fatores extremamente importantes. O primeiro, usado para destruição dos possíveis contaminantes presentes e o segundo, como agente de conservação, mantendo a velocidade das reações enzimáticas que possam ocorrer, a níveis relativamente baixos, ou, como inibidor do crescimento de microrganismos, que possam ter sobrevivido ao tratamento térmico (GALLO, 1978 e FROEDER et al, 1985).

Muito antes da implantação das práticas de resfriamento, refrigeração e pasteurização, foi observado que a manufatura do queijo convertia o leite, alimento líquido de alta perecibilidade, em queijo, um alimento semi-sólido de menor perecibilidade. A maior parte dos nutrientes, proteínas e gorduras do leite são preservadas no processo de manufatura do queijo e, nesta forma, poderá ter durabilidade muito maior do que na original de leite líquido (ZOTTOLA & SMITH, 1991).

Durante a fabricação de queijos, estes, em sua maioria, são submetidos a uma fermentação ácida, que modifica a flora bacteriana, o pH, a atividade de água, de modo a

evitar, até certo ponto, a multiplicação de agentes patogênicos (RIEDEL, 1992).

A legislação brasileira determina que os queijos devem ser elaborados a partir de leite pasteurizado. Na tecnologia do queijo, considera-se queijo fresco ou queijo cru aquele que não foi submetido à fermentação e não aquele feito de leite não pasteurizado (RIEDEL, 1992).

Na prática, os padrões muitas vezes não são seguidos, como é o caso do queijo "Minas Frescal", que é comumente fabricado em pequenas propriedades, artesanalmente, a partir de leite cru.

De acordo com OTERO et al (1988), o perigo potencial de intoxicação alimentar estafilocócica associada a queijos frescos é alto, devido às características deste produto lácteo, ou seja, umidade, atividade de água e pH elevados e baixa quantidade de cloreto de sódio e ácido láctico. Isto coloca os queijos frescos, juntamente com o leite cru, entre os veículos mais importantes de surtos de intoxicações alimentares envolvendo produtos lácteos (BRYAN, 1983).

Estudos também têm envolvido o leite pasteurizado como veículo de intoxicações alimentares estafilocócicas e, neste caso, as pesquisas têm mostrado que houve falha durante processamento ou contaminação pós-pasteurização (MARSHALL, 1992).

A qualidade e durabilidade do leite pasteurizado e seus derivados está intimamente ligada à qualidade da

matéria-prima. É impossível somente por meio da pasteurização, transformar o leite cru de qualidade inferior em leite de boa qualidade. O sistema de pasteurização não corrige os defeitos provenientes de más condições de higiene durante e após a ordenha (BUSANI & OLIVEIRA, 1989).

Além desse, outros problemas também interferem na qualidade final do leite pasteurizado e derivados. No setor industrial, ao lado de instalações relativamente modernas e adequadas, encontram-se deficiências no controle de qualidade e do processamento. O ponto de estrangulamento evidenciado na distribuição e comercialização dos produtos lácteos é crítico, por um lado devido ao valor comercial ou margem de lucro do produto, por outro lado pela falta de um sistema eficiente de fiscalização das condições de estocagem destes produtos nos pontos de venda ao consumidor (OLIVEIRA & BORGES, 1984).

A manutenção do leite e grande parte dos produtos lácteos no comércio varejista deve ser feita sob refrigeração em temperaturas ao redor de 5°C, mas nunca acima de 10°C (RIEDEL, 1992). Muitos comerciantes não dispõem de instalações em número suficiente para armazenar todos os produtos lácteos adequadamente, os quais frequentemente são comercializados fora dos limites adequados de temperatura e, por consequência, com características microbiológicas fora dos padrões regulamentares, constituindo-se, portanto, em risco potencial para os consumidores (NADER FILHO et al, 1988).

Praticamente, todos os incidentes de envenenamento alimentar estafilocócico, incluindo aqueles causados pelos produtos lácteos, têm sido atribuídos ao *Staphylococcus aureus*, o qual é o agente causador de intoxicação alimentar mais comum em todo o mundo. Este microrganismo produz enterotoxinas termoestáveis, capazes de resistir à pasteurização do leite, bem como às condições durante e após a manufatura de queijos (GÓMEZ-LUCIA et al, 1992).

Deste modo, alimentos que tenham sido processados adequadamente e apresentem contagem bacteriológica dentro dos padrões legais, poderão vir a provocar intoxicação estafilocócica se, em algum estágio da produção, o *Staphylococcus aureus* cresceu e produziu enterotoxina suficiente para causar a doença.

3.2. Classificação e características gerais de *Staphylococcus aureus*

Provavelmente, quem primeiro descreveu os estafilococos foi Alexander Ogston, em 1880, na Escócia, quando da publicação de seus estudos, os quais demonstravam que cocos que formavam cachos, causavam inúmeras doenças piogênicas no homem, sendo tal organismo denominado posteriormente de "*Staphylococcus*", um nome derivado do grego, onde "staphylo" significa cacho de uvas e "coccus" significa um grão de semente (BAIRD-PARKER, 1990).

Rosenbach, em 1884, foi provavelmente quem primeiro isolou o estafilococos em cultura pura e estudou suas características em laboratório. Ele observou colônias brancas e laranjas em meio sólido e nomeou o organismo que produzia colônias laranjas de *Staphylococcus pyogenes aureus* e o que produzia colônias brancas de *Staphylococcus pyogenes albus* (BAIRD-PARKER, 1990).

Ao longo dos anos, com o desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao *Staphylococcus*, surgiram muitas controvérsias sobre a posição sistemática dessas bactérias.

Atualmente, de acordo com a nona edição do manual de Bergey (1986), o gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, sendo descritas 19 espécies, dentre elas o *Staphylococcus aureus*, o qual é considerado o maior agente causador de envenenamento alimentar (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

A importância das intoxicações alimentares causadas por *Staphylococcus aureus* tem conduzido muitas pesquisas no sentido de determinar os parâmetros relacionados ao seu crescimento e produção de enterotoxinas.

As células de *Staphylococcus aureus* consistem de cocos desprovidos de motilidade, Gram positivos, esféricos, com 0,5-1,0µm de diâmetro, geralmente arranjados na forma de cachos irregulares. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria mesófila, anaeróbia facultativa, que apresenta crescimento mais rápido em condições aeróbias, fermenta o manitol e vários outros açúcares formando ácido, mas não gás

(KLOOS, 1990). O principal produto da fermentação da glicose é o ácido láctico, enquanto na presença de oxigênio, os produtos finais do metabolismo da glicose são o ácido acético e o gás carbônico (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

O *Staphylococcus aureus* reduz o nitrato e produz grande variedade de enzimas, tais como a catalase, coagulase, gelatinase, nuclease termoestável, hemolisinas, lecitinase e outras. Além disso, como enfatizado anteriormente, algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* produzem enterotoxinas extracelulares, as quais são responsáveis por casos de intoxicação alimentar (KLOOS, 1990).

A enzima catalase produzida por *Staphylococcus aureus* catalisa a quebra do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água. O peróxido de hidrogênio resulta da respiração aeróbia normal e é altamente tóxico, podendo apresentar efeito bactericida se não for degradado (ANDREWS & MARTIN, 1979a).

A síntese de catalase por *Staphylococcus aureus* poderá ser influenciada por situações de "stress", tais como o tratamento térmico sub-letal, atividade de água reduzida ou outras situações que tornem as células injuriadas (FLOWERS et al, 1977; TROLLER & STINSON, 1978; ANDREWS & MARTIN, 1979a e ANDREWS & MARTIN, 1979b).

TROLLER & STINSON (1978) avaliaram duas linhagens de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas (196E e C243) quanto à sua capacidade de produzir inúmeras enzimas extracelulares em vários níveis de atividade de água e

observaram, que as duas linhagens testadas produziram níveis máximos de catalase, no maior nível de atividade de água testado, ou seja, 0,996. A síntese de catalase por *Staphylococcus aureus* C243 foi bastante limitada pela redução da atividade de água para 0,94. A enzima não foi detectada, ainda que as contagens indicassem 10^9 UFC/ml.

O *Staphylococcus aureus* pode produzir diferentes tipos de hemolisinas, tais como as hemolisinas alfa, beta, gama e delta. A beta-hemolisina apresenta-se mais frequentemente relacionada a linhagens de origem animal (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

Estudos têm mostrado que grande porcentagem das linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de fontes clínicas e de leite apresentam atividade hemolítica.

COSTA & LEVY (1989) isolaram 101 linhagens de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas procedentes de diferentes materiais clínicos, a fim de avaliar comparativamente testes utilizados para a caracterização desta espécie. Os resultados mostraram que 99 linhagens identificadas produziram hemólise ampla (dentro de 24 a 36h), de modo que o teste de hemólise revelou sensibilidade de 98% em relação às linhagens coagulase positivas.

BECKER et al (1989) isolaram 440 linhagens de *Staphylococcus* a partir de leite cru proveniente da região da Bavária, Alemanha, tendo sido identificadas 387 linhagens de *Staphylococcus aureus*, todas coagulase positivas. Destas, 94,8% produziram beta-hemólise, enquanto somente 1 das 57

outras Micrococcaceae produziram a enzima. A produção de beta-hemolisina é vista como a propriedade mais estável dos *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

O estudo realizado por GARCIA et al (1980), envolveu a análise de 57 linhagens de cocos Gram positivos, catalase positivos, considerados agentes etiológicos da mastite clínica e sub-clínica em bovinos. Foram identificadas 46 linhagens de *Staphylococcus aureus*, as quais produziram hemólise. Grande porcentagem (90%) destas linhagens produziram beta-hemolisina, enquanto apenas 61% produziram alfa-hemolisina. Estes mesmos autores observaram que 91,3% (42) das linhagens de *Staphylococcus aureus* identificadas produziram gelatinase, mas esta característica não se mostrou específica, já que inúmeras outras espécies de *Staphylococcus* também produziram a enzima.

A ação da lecitinase estafilocócica sobre uma das lipoproteínas da gema do ovo é uma característica usada na identificação de *Staphylococcus aureus* sobre o ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989a). Além desta característica, as colônias de *Staphylococcus aureus* crescendo sobre o ágar Baird-Parker são facilmente reconhecidas por apresentarem cor negra, devido à redução aeróbia do telurito a telurito metálico (MINOR & MARTH, 1971). Outra vantagem do ágar Baird-Parker é que apresenta alta seletividade, inibindo o crescimento de muitas bactérias presentes em alimentos. Além disso, as células estressadas de *Staphylococcus aureus* são mais eficientemente

identificadas com o ágar Baird-Parker do que pelos meios não seletivos (ICMSF, 1984; LACHICA, 1984). Este meio de cultura tem ampla aceitação no diagnóstico de *Staphylococcus aureus* (NISKANEN & AALTO, 1978; RAYMAN et al, 1978; BENNETT, 1984; ICMSF, 1984; KLOOS & SCHKEIFER, 1986; RAYMAN et al, 1988; HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989b; AOAC, 1990 e VAN NETTEN et al, 1990).

Dentre as características importantes que têm sido usadas na identificação de *Staphylococcus aureus*, tem-se a produção de nuclease termorresistente e coagulase (SPERBER & TATINI, 1975; GARCIA et al, 1980; BENNETT, 1984; CASTRO, 1984; ICMSF, 1984; BENNETT et al, 1986 e AOAC, 1990).

A nuclease estafilocócica é uma enzima extracelular, termorresistente, produzida por 90% ou mais das linhagens de *Staphylococcus aureus* (KLOOS & SCHLEIFER, 1986). Atua sobre o ácido desoxirribonuclêico (DNA) e o ácido ribonuclêico (RNA), catalisando a reação de produção de fosfomononucleotídeos (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989a e KOHLI et al, 1989). O aquecimento da nuclease estafilocócica a 100°C por 60 min. causa pequena perda na atividade da enzima, enquanto nenhuma alteração significativa é observada quando submetida a fervura por 15 min. (LACHICA et al, 1971 e PARK et al, 1980).

De acordo com LACHICA et al (1972), a termonuclease estafilocócica adicionada ao leite, caldo infusão de cérebro e coração e solução salina, apresentou tolerância marcante ao aquecimento a 60°C e 97°C por 60min.

Os resultados mostraram que a nuclease foi mais resistente em leite e caldo infusão de cérebro e coração do que em solução salina. Durante o teste de estocagem de alimentos, adicionou-se 5µg/g de termonuclease em leite em pó desnatado, o qual foi estocado a 37, 25 e 5°C. Após 10 meses todas as amostras de alimentos apresentaram atividade da nuclease após aquecimento por 15 min.

Além do *Staphylococcus aureus*, poucos organismos têm sido identificados como produtores de nuclease termoestável.

LACHICA et al (1971) observaram que algumas linhagens de *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus* sp produzem nuclease, as quais apresentaram atividade apenas antes do aquecimento da cultura. De acordo com KLOOS & SCHLEIFER (1986), dentre as diferentes espécies de *Staphylococcus*, somente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* subesp. *hyicus* produzem nuclease termoestável. Estas duas últimas espécies são facilmente diferenciadas de *Staphylococcus aureus* através de testes rotineiros de identificação e, além disso, suas nucleases termoestáveis são sorologicamente diferentes daquelas produzidas por *Staphylococcus aureus* (BECKER et al, 1989).

PARK et al (1980) analisaram 1204 culturas pertencentes a 16 gêneros diferentes quanto à produção de termonuclease e verificaram que, além de *Staphylococcus*, apenas os gêneros *Streptococcus* e *Bacillus* foram capazes de

produzir termonuclease. Além disso, esses microrganismos produziram nuclease menos termorresistente e em menor quantidade, quando comparada à nuclease produzida pelos *Staphylococcus* coagulase positivos. O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi analisado, tendo-se obtido atividade ótima em valores de pH entre 8,5 a 10,0 para os 3 gêneros produtores de nuclease, indicando que a atividade relativa da enzima quanto ao pH, não pode ser usada para diferenciar termonuclease estafilocócica de não estafilocócica. ERIKSON & DEIBEL (1973) encontraram resultados similares e observaram atividade ótima da nuclease em pH 9,2.

De acordo com o estudo de PARK et al (1980), citado anteriormente, a produção de nuclease termorresistente parece estar mais intimamente relacionada com estafilococos coagulase positivos, já que de um total de 224 estafilococos coagulase positivos testados, 222(99%) produziram nuclease termoestável e somente 27(18%) dos 148 estafilococos coagulase negativos testados produziram a enzima.

LACHICA et al (1969) também estudaram a relação entre a produção de coagulase e nuclease termoestável por *Staphylococcus aureus* e observaram que, de um total de 275 linhagens coagulase positivas isoladas de alimentos e fontes clínicas, 262 (95%) também produziram nuclease termoestável.

No estudo realizado por ROSSI-JÚNIOR et al (1985), foram efetuados testes de coagulase e termonuclease em 345 linhagens de *Staphylococcus* sp., isoladas de amostras de leite "in natura", com o objetivo de verificar a relação

entre os dois testes de identificação. Os resultados apresentaram elevada correlação (87,5%) entre as duas provas efetuadas, sugerindo a utilização tanto do teste de coagulase como da termonuclease na identificação de *Staphylococcus aureus*.

A estabilidade térmica dessa enzima e sua associação quase exclusiva com o crescimento de *Staphylococcus aureus* colocam a análise da termonuclease entre os testes rotineiros na descrição desta bactéria. Atualmente, o método mais amplamente utilizado para detectar linhagens estafilocócicas produtoras de nuclease termoestável é o descrito por LACHICA et al (1971), que consiste de um método simples e rápido, baseado no efeito metacromático do ágar e DNA sobre o corante azul de toluidina. A estabilidade do ágar-DNA-azul de toluidina pode ser atribuída à propriedade inibidora do azul de toluidina contra bactérias Gram positivas, especialmente esporulantes e à estabilidade do complexo DNA-azul de toluidina ao aquecimento.

O teste da nuclease termoestável é considerado menos subjetivo e tão específico quanto o teste de coagulase, já que a cor do meio de cultura muda de azul para rosa. Entretanto, não é usado para substituir o teste da coagulase, mas como teste complementar, particularmente para reações de coagulase 2+ (BENNETT, 1984).

De acordo com SPERBER & TATINI (1975), a subjetividade do teste de coagulase refere-se aos diferentes graus de coagulação do plasma sanguíneo avaliados na leitura

do teste, que enquadra os resultados em uma escala que vai de 1+ a 4+. Estes autores encontraram dificuldade na interpretação destas reações, especialmente as reações de 1+ até 3+ e resolveram verificar a validade do teste de coagulase na identificação de *Staphylococcus aureus* em alimentos. Estes autores analisaram 508 linhagens de *Staphylococcus* provenientes de alimentos, animais e humanos e verificaram que 439 linhagens apresentaram reação da coagulase 4+, sensibilidade à lisostafina e produziram termonuclease, sendo portanto identificadas como *Staphylococcus aureus*. Um grupo de 69 linhagens apresentou reação de coagulase entre 2+ e 3+ e não apresentou características de *Staphylococcus aureus*, quando outros testes foram efetuados, levando-os a concluir que linhagens apresentando resultados para o teste de coagulase entre 1+ e 3+ deverão ser submetidas a outros testes complementares, tais como a fermentação anaeróbia da glicose e produção de termonuclease.

GARCIA et al (1980), analisando 57 linhagens bacterianas provenientes do úbere de vacas com mastite clínica e sub-clínica, também observaram que a identificação de *Staphylococcus*, baseando-se unicamente no teste da coagulase, não é suficiente, principalmente quando a reação da coagulase é menor que 3+. Somente uma linhagem identificada como *Staphylococcus aureus* apresentou reação de coagulase 2+, mas suas outras propriedades, tais como produção de termonuclease, hemolisina, sensibilidade à

lisostafina e fagotipagem incluíram-na nesta espécie. Dentre as 46 linhagens identificadas como *Staphylococcus aureus*, houve correlação de 99,7% entre a reação de coagulase 3+ e 4+ e produção de termonuclease, de modo que somente 2 das 7 linhagens que deram reação de coagulase 2+, produziram esta enzima.

A produção de coagulase tem sido a característica mais usada para distinguir linhagens de *Staphylococcus aureus* patogênicas das não patogênicas, mas não tem se mostrado suficiente para determinar a patogenicidade (KLOOS, 1990).

Segundo MORTON & COHN (1972), *Staphylococcus* coagulase negativo, enterotoxina positivo tem produzido surtos de gastroenterite alimentar, de modo que não existe uma correlação definida para a produção de enterotoxina e coagulase por *Staphylococcus*.

São conhecidas sete coagulases extracelulares de estafilococos, mas a única função patogênica sugerida para a enzima é o revestimento dos organismos com fibrina, a fim de inibir a fagocitose. A enzima exerce um efeito de coagulação do plasma derivado de diversas espécies animais, resultante da conversão do fibrinogênio a fibrina (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989b).

Como enfatizado anteriormente, o teste de coagulase, é amplamente utilizado na identificação do *Staphylococcus aureus* a partir de bovinos e exames de alimentos, mas possui a limitação de apresentar um longo

período de incubação, cerca de 24h, o que tem levado ao desenvolvimento de métodos de identificação alternativos, tal como o teste de "clumping" (teste de coagulação), que é baseado na determinação do fator "clumping", o qual é detectado através da aglutinação de hemácias sensibilizadas com fibrinogênio. O fator "clumping" reage com o fibrinogênio ou seus derivados e pode ser detectado dentro de poucos segundos por um teste em lâmina (BECKER et al, 1989).

O teste em lâmina para o fator "clumping" é utilizado na detecção da coagulase fixa, a qual somente é liberada para o meio pela autólise ou ruptura das células, enquanto o teste de coagulase em tubo é recomendado para a detecção de coagulase livre ou extracelular (LEITÃO, 1973; KLOOS & SCHLEIFER, 1986 e COSTA & LEVY, 1989).

No Brasil, foi recentemente introduzido um reativo denominado "Staph-test", com a finalidade de determinar o fator "clumping" do *Staphylococcus aureus*. FRANCO & NIELSEN (1988) avaliaram a sensibilidade deste teste, analisando 485 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos quanto à produção de coagulase em tubo e fator "clumping", verificando 99,2% de correlação entre os dois testes.

GATTI et al (1988) também realizaram estudo comparativo entre o "Staph-test" e o teste de coagulase em tubo. Estes autores analisaram 75 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas de bovinos e suínos e encontraram,

respectivamente, correlações de 94,4% e 89,1% entre os dois testes.

De modo geral, estando presente em alimentos, o *Staphylococcus aureus* poderá multiplicar-se e atingir número suficiente para a produção de doses eméticas de enterotoxinas, porém, algumas características fisiológicas dessa bactéria, são importantes para que isso possa ocorrer.

A produção de enterotoxinas nos alimentos é influenciada por vários fatores ambientais tais como o pH, temperatura de estocagem e composição do alimento. As necessidades nutricionais e a presença de microrganismos competidores também poderão aumentar ou inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus* e, deste modo, influenciar a produção de enterotoxina (LOPES et al, 1993).

Segundo HALPIN-DOHNALEK & MARTH (1989), os resultados das pesquisas relacionadas ao estudo das interações entre as linhagens de *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos estão longe de ser conclusivas.

O *Staphylococcus aureus* desenvolve-se em ampla faixa de temperatura: 7 a 47,8°C, com ótimo em 37°C. Os valores correspondentes para a produção de enterotoxina estão entre 10 a 46°C, com ótimo entre 40 a 45°C (TATINI, 1973). HALPIN-DOHNALEK & MARTH (1989b) também descrevem valores similares, com faixa de crescimento variando de 6,5 a 50°C e a temperatura ótima entre 30 e 40°C. A faixa de temperatura para a produção de enterotoxina esteve entre 10 e 48°C, com ótimo entre 40 e 45°C (BAIRD-PARKER, 1990).

De acordo com SCHMITT et al (1990), a temperatura mínima e máxima de crescimento, detectada para *Staphylococcus aureus* incubado por 7 dias em caldo infusão de cérebro e coração foi, respectivamente, 11 e 44°C. A temperatura mínima para a produção de enterotoxina variou de 14 a 38°C, enquanto a máxima esteve entre 35 a 45°C, dependendo da linhagem estudada.

TIBANA et al (1987) verificaram que, após 180min. de aquecimento à 80°C, ainda havia 22% e 15% de atividade das enterotoxinas do tipo A e B, enquanto que a 100°C/90min e 120°C/30min, estas enterotoxinas foram completamente inativadas. A enterotoxina estafilocócica C foi a mais termorresistente. A 80°C/180min., a enterotoxina C ainda apresentava 30% de atividade, sendo completamente inativada a 120°C/60min.

Os valores de pH que permitem crescimento de *Staphylococcus aureus* estão entre 4,0-10,0 com ótimo na faixa de 6,0-7,0. A produção de enterotoxina se dá entre pH 4,0-9,6, estando o ótimo entre 7,0-8,0 (BAIRD-PARKER, 1990). EWALD & NOTERMANS (1988) consideraram o valor de pH próximo ao 7,0 como ótimo para crescimento e produção de enterotoxina.

Sendo um microrganismo anaeróbio facultativo, a atmosfera de crescimento poderá influenciar o desenvolvimento e a produção de enterotoxina por *Staphylococcus aureus*.

Em alimentos, tem-se observado crescimento e produção de enterotoxina estafilocócica em condições

anaeróbias. Entretanto, semelhantemente ao que ocorre em meios de cultura, a produção de enterotoxina é maior sob condições aeróbias (SMITH et al, 1983).

A aeração excessiva poderá levar à redução na quantidade de enterotoxina produzida sem alterar a taxa de crescimento (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989b). BAIRD-PARKER (1990) considerou a concentração de oxigênio de 5-20% como a faixa ótima para a produção de enterotoxina.

Os estudos sobre a composição atmosférica do meio e seu efeito sobre o crescimento e produção de enterotoxina por *Staphylococcus aureus* têm se mostrado contraditórios, havendo carência de estudos definitivos (SMITH et al, 1983).

O caráter halofílico de *Staphylococcus aureus* é bastante importante, já que a maior parte das linhagens de *Staphylococcus aureus* multiplicam-se bem em meios com 10% de cloreto de sódio, com crescimento reduzido a 15% (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

KOUJIMA et al (1978) estudaram a adaptação de *Staphylococcus aureus* a variações na salinidade do meio de cultura e observaram que a tolerância de *Staphylococcus aureus* ao sal, parece ocorrer inicialmente pela desidratação da célula após ser transferida de um meio de baixa salinidade para outro de alta salinidade e, posteriormente, pelo acúmulo de prolina, a qual liga-se à água, transportando-a para dentro da célula.

Alguns estudos têm indicado que o cloreto de sódio a 1,0M poderá exercer efeito protetor às células de *Staphylococcus aureus*, quando incubadas em temperaturas acima de seu limite de crescimento.

De acordo com HUGHES & HURST (1980), o limite máximo de temperatura para crescimento de uma linhagem de *Staphylococcus aureus* produtora de enterotoxina A (MF 31) e uma produtora de enterotoxina B (S6) é 44 e 45°C, respectivamente, tanto em meio básico de peptona, quanto em caldo infusão de cérebro e coração. Na presença de cloreto de sódio a 1,0M, o crescimento, a produção de enterotoxina, de coagulase e nuclease termoestável, ocorreram até 2°C acima do limite de crescimento citado anteriormente.

HURST et al (1984), dando continuidade ao estudo anterior, utilizaram os mesmos meios de cultura, juntamente com a linhagem de *Staphylococcus aureus* MF 31 e testaram o efeito protetor individual e combinado do cloreto de sódio a 1,0M e alguns aminoácidos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que os aminoácidos glutamato monossódico, prolina, treonina, ácido aspártico e betaína, assim como o cloreto de sódio a 1,0M, também habilitaram as células de *Staphylococcus aureus* a crescerem 2°C acima de seu limite máximo de crescimento, ou seja, até 46°C. Verificou-se que o cloreto de sódio a 1,0M causou plasmólise em *Staphylococcus aureus*. Quanto ao efeito combinado destes protetores, os autores sugeriram que o crescimento a 46°C na presença de cloreto de sódio e

aminoácidos pode ser explicado, em parte, pelo aumento interno do "pool" de aminoácidos e que, externamente, o suporte osmótico foi dado pelos ânions cloreto eliminados pelas células.

Staphylococcus aureus tem se mostrado mais tolerante a baixos valores de atividade de água (Aa) do que outras bactérias associadas a alimentos, o que tem suscitado inúmeras pesquisas relacionadas à influência da Aa para seu crescimento e produção de enterotoxinas.

TROLLER (1972), estudando o efeito de diferentes valores de Aa sobre o *Staphylococcus aureus* 196E, observou que o número máximo de estafilococos, ou seja, 3.10^{10} UFC/ml presentes na cultura controle apresentando Aa=0,99, foi reduzido para 4.10^8 UFC/ml em cultura com Aa ajustada para cerca de 0,88.

As interações entre a Aa e a temperatura também podem influenciar o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

HORNER & ANAGNOSTOPOULOS (1975) estudaram a viabilidade de *Staphylococcus aureus* aquecidos a 55°C em tampão fosfato e recuperados em ágar soja triptona ajustado a diferentes níveis de atividade de água. Os resultados mostraram que a Aa mínima para a formação de colônias a partir de células aquecidas e não aquecidas, dependeu do soluto utilizado para alterar a Aa do meio, sendo 0,93 quando se usou glicerol e 0,90 para o cloreto de sódio e sacarose.

LOTTER & LEINSTNER (1978) mostraram que a Aa mínima para crescimento e produção de enterotoxina A para as

linhagens de *Staphylococcus aureus* 100 e M7/1 esteve entre 0,864 e 0,867, quando as culturas foram incubadas por 7 dias a 30°C. A atividade de água mínima aumentou para valores entre 0,870 e 0,887 com a redução da temperatura para 25°C.

O estudo realizado por TROLLER & STINSON (1978), examinou a capacidade de duas linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* (196 E e C243) produzirem enzimas extracelulares em vários níveis de atividade de água. De acordo com os resultados, as duas linhagens testadas produziram as maiores quantidades de catalase e coagulase no maior nível de Aa testado, ou seja, 0,996, enquanto que a atividade mínima da coagulase foi registrada no menor valor de Aa testado, ou seja, 0,91. As variações nos níveis de Aa influenciaram a produção de enterotoxinas; entretanto, a produção de enterotoxina A pareceu responder menos ao ajuste da Aa do meio do que a produção de enterotoxina B. Diferentemente das linhagens que produzem enterotoxina A ou C, aquelas que produzem enterotoxina B, raramente são associadas a surtos de envenenamento alimentar. Isto pode ser devido à maior sensibilidade das linhagens produtoras de enterotoxina B a pequenas reduções nos níveis de Aa (TROLLER, 1972).

Em relação à influência da Aa na produção de enterotoxina D, EWALD & NOTERMANS (1988) demonstraram que sob condições ótimas de crescimento em caldo infusão de cérebro e coração, a Aa mínima e máxima para produção de enterotoxina D

é 0,86 e 0,98, respectivamente. Não se detectou produção de enterotoxina D em níveis de $Aa=0,84$.

De acordo com CHIRIFE et al (1982), as linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, C243, S6 e 196E, não cresceram em caldo infusão de cérebro e coração com Aa ajustada com cloreto de sódio entre 0,83 a 0,84, contrariando os resultados obtidos por outros estudos. Os autores atribuíram as diferenças nos resultados à natureza da substância usada para ajustar a Aa, diferenças nos meios de cultura utilizados ou nas medidas de Aa.

Segundo BAIRD-PARKER (1990), em ambientes aeróbios a Aa mínima para crescimento de *Staphylococcus aureus* é de 0,83, enquanto que em condições anaeróbias a Aa mínima é de 0,90, sendo o valor ótimo 0,98. Em relação à produção de enterotoxinas, a Aa mínima para condições aeróbias e anaeróbias são 0,85 e 0,92, respectivamente, enquanto o valor ótimo é de 0,98.

SMITH (1983) analisou inúmeros estudos relacionados ao crescimento de *Staphylococcus aureus* em diferentes valores de Aa e concluiu que a Aa mínima para crescimento deste microrganismo está relacionada a outros parâmetros ambientais e nutricionais. Quando tais parâmetros desviam-se do ótimo, a atividade de água mínima tolerada por *Staphylococcus aureus* é elevada.

Do exposto nos diferentes estudos citados acima, depreende-se que a identificação bem como a capacidade patogênica de determinada linhagem de *Staphylococcus aureus*,

deverão ser estabelecidas através de inúmeros testes bioquímicos, os quais, em conjunto, poderão identificar sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se sob várias condições ambientais, bem como produzir vários compostos extracelulares que são tóxicos ao Homem (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989b).

3.3. Epidemiologia e patogenia

Devido a ampla distribuição dos estafilococos no meio ambiente (ar, poeira, água, alimentos, esgoto, humanos e animais), este organismo é causa de preocupação constante para os órgãos de saúde pública (BENNETT et al, 1986).

Dentre a grande variedade de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, as principais são: furúnculos, carbúnculos, impetigo, necrose epidérmica tóxica, pneumonia, osteomielites, meningite, endocardites, mastites, bacteremia, vários abscessos, intoxicação alimentar, enterocolites, infecções urogenitais e síndrome do choque tóxico (KLOOS & SCHLEIFER, 1986).

Os principais habitats de *Staphylococcus aureus* incluem as membranas mucosas da nasofaringe e pele e, algumas vezes, em menor extensão, o períneo, trato gastrointestinal e trato genital de animais de sangue quente (KLOOS & SCHELEIFER, 1986). Os bovinos, quando comparados ao Homem e à maioria dos outros animais, são considerados os principais reservatórios de *Staphylococcus aureus*. No homem o principal

local de crescimento do microrganismo são as fossas nasais, contaminadas nos primeiros dias de vida. De modo geral, os alimentos de origem animal são importantes reservatórios de *Staphylococcus* na cadeia alimentar (GENIGEORGIS, 1989).

Dentre os alimentos que melhor permitem o desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, têm-se os alimentos proteínáceos e/ou aqueles com altos níveis de sal ou açúcar, tais como as carnes, aves, peixes, leite e produtos lácteos, pudins, bombas de padaria, bolos e saladas (INSTITUTE of Food Technologists, 1988 e ISIGIDI et al, 1992).

Tradicionalmente, o leite cru ou não pasteurizado tem sido considerado o maior veículo de transmissão de patógenos, inclusive de *Staphylococcus aureus*. Este microrganismo é considerado causa comum da mastite, sendo freqüentemente observado no úbere e nos canais das tetas das vacas, podendo, portanto, atingir facilmente o leite.

MATOS et al (1991) analisaram 163 novilhas e verificaram que os *Staphylococcus aureus* foram isolados de outros locais, além da glândula mamária em lactação, tais como a cama dos animais, forragem, mãos e narinas dos trabalhadores.

Se os equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite, durante a ordenha e nas diferentes etapas de seu processamento, não forem adequadamente lavados e sanitizados após uso, apresentarão resíduos de leite que permitirão o crescimento de *Staphylococcus aureus*. O leite e

derivados também podem ser contaminados pelo manuseio ou descargas nasais de trabalhadores em plantas de processamento ou em laticínios. Como enfatizado anteriormente, uma vez presente no leite e encontrando condições ambientais favoráveis, os estafilococos poderão multiplicar-se e produzir enterotoxinas no alimento e causar a doença (BRYAN, 1983).

O envenenamento alimentar estafilocócico é uma intoxicação causada pelo consumo de alimentos contendo exotoxinas preformadas (enterotoxinas), produzidas principalmente por linhagens de *Staphylococcus aureus*, ainda que as novas espécies, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, têm sido notificadas como enterotoxigênicas (GENIGEORGIS, 1989 e BERGDOLL, 1990).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por cólicas abdominais severas, suor, náuseas, diarreia e vômito, dor de cabeça e, em alguns casos, prostração, que ocorrem geralmente de 2-6 horas após a ingestão do alimento contendo a enterotoxina bacteriana. Entretanto, poderá ocorrer também dentro de 30min-8h, dependendo do estado de contaminação do alimento e da susceptibilidade do indivíduo. A duração dos sintomas é de 24 a 48 horas e a doença raramente é fatal, mas, faz-se necessário o restabelecimento do equilíbrio fluido, para compensar a perda através da diarreia e vômito (GRAVANI, 1984; INSTITUTE of Food Technologists, 1988 e HALPIN-DOHNALEK, 1989).

Para que o envenenamento estafilocócico ocorra efetivamente, são necessárias algumas condições, tais como: o alimento precisa ser contaminado com estafilococos produtor de enterotoxina; deverá permitir o crescimento do contaminante e apresentar temperatura suficientemente alta e por período de tempo que permita o crescimento e produção de níveis eméticos da enterotoxina e, por último, o alimento deverá ser consumido (GRAVANI, 1984).

A quantidade de enterotoxinas presente nos alimentos envolvidos em surtos de envenenamento alimentar pode variar consideravelmente, de menos de 1ng/g a mais de 1µg/g (BERGDOLL, 1990).

As enterotoxinas responsáveis pela doença são proteínas solúveis em água, com cadeia globular única e peso molecular entre 28.000 e 35.000 daltons. Na maioria dos surtos de envenenamento alimentar estafilocócico, uma única linhagem enterotoxigênica é isolada; entretanto, inúmeras destas linhagens produzem mais de uma enterotoxina estafilocócica (BRYANT et al, 1988 e CARMO & BERGDOLL, 1990). São conhecidos sete sorotipos de enterotoxinas estafilocócicas associadas com intoxicação alimentar (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989b e ISIGIDI et al, 1992), as quais foram denominadas de tipo A (CASMAN et al, 1963), B (CASMAN et al, 1963), C₁, C₂ (BERGDOLL et al, 1965), C₃ (REISER et al, 1984), D (CASMAN et al, 1967) e E (BERGDOLL et al, 1971).

A enterotoxina A é a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Esta enterotoxina apresentou-se associada a 76%(95) das linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carnes e produtos lácteos. Por outro lado, as enterotoxinas estafilocócicas B e C raramente são detectadas em alimentos envolvidos em surtos, ainda que sejam produzidas em grandes quantidades em meio de cultura (PAYNE & WOOD, 1974; LOPES et al, 1991 e LOPES et al, 1993).

Exames de alimentos envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica no Brasil, revelaram somente a presença de enterotoxina estafilocócica A, embora as linhagens de *Staphylococcus aureus* envolvidas tenham produzido em meio de cultura, tanto a enterotoxina A como as do tipo B e C (LOPES et al, 1993).

BRYANT et al (1988) estudaram a produção de enterotoxina em caldo infusão de cérebro e coração, por linhagem de *Staphylococcus aureus* produtora de enterotoxinas dos tipos A e C, isoladas de queijo Tortellini envolvido em surto de intoxicação alimentar estafilocócica. A enterotoxina estafilocócica A foi detectável quando a contagem atingiu 10^7 UFC/g, enquanto a detecção da enterotoxina C foi verificada em contagens de 10^9 UFC/g e somente 4 h após a detecção da enterotoxina A.

A produção de enterotoxina estafilocócica A ocorre em menor período de incubação do que a produção de enterotoxina B ou C. Esta pode ser uma das razões pela qual a

enterotoxina A é a envolvida na maior parte dos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (LOPES, et al, 1993).

O mecanismo de ação das enterotoxinas ainda não está bem definido, mas algumas evidências sugerem que seu efeito emético esteja envolvido tanto com o epitélio intestinal quanto com o centro do vômito no sistema nervoso central (CASTRO, 1984 e ARBUHNOTT et al, 1990).

De acordo com HALPIN-DOHNALEK & MARTH (1989b), as enterotoxinas estafilocócicas produzem impulsos que atingem o centro sub-cortical do vômito no cérebro, via nervo vago e aferentes simpáticos. Sendo assim, baseando-se em seu modo de ação, as toxinas estafilocócicas poderiam ser consideradas neurotoxinas.

Todos os métodos de detecção de enterotoxinas são baseados no uso de anticorpos preparados contra as enterotoxinas. Estes anticorpos policlonais reagem com as enterotoxinas em géis, dando reações de precipitina, tornando-os altamente específicos (BERGDOLL, 1990).

Sendo assim, para a detecção sorológica das enterotoxinas, tem-se empregado diversos métodos que utilizam anticorpos específicos. Entre estes métodos encontram-se a técnica de sensibilidade ótima em placa, a técnica dos anticorpos fluorescentes, a técnica de inibição da hemoaglutinação, a técnica de imunodifusão dupla em lâmina, a técnica de hemoaglutinação passiva reversa, a técnica do ELISA e a técnica de radioimunoensaio (ICMSF, 1978).

Os métodos de difusão em gel, tal como o de sensibilidade ótima em placa, são procedimentos padrões utilizados na detecção da produção de enterotoxinas por estafilococos, juntamente com métodos que possibilitem a produção de quantidades relativamente grandes da enterotoxina, tais como o método do celofane sobre o ágar e o método de cultura em saco. Uma vantagem dos métodos de difusão em gel é que não necessitam de reagentes especiais além do antisoro específico e enterotoxina purificada (PEREIRA et al, 1991). O princípio do método baseia-se na formação de uma linha de precipitação, quando o tipo sorológico da enterotoxina difunde-se através do gel e reage com seu anticorpo específico. A coalescência com a linha de precipitação de referência confirma o resultado (AOAC,1990). A sensibilidade de 0,1 - 0,5µg/ml tem sido considerada suficiente para identificar linhagens produtoras de enterotoxinas (PEREIRA et al, 1991).

Somente cerca de 5% dos surtos de envenenamento alimentar nos quais os estafilococos foram isolados, apresentaram resultados negativos para as enterotoxinas pelos métodos de difusão em gel e têm sido considerados, causados por enterotoxinas estafilocócicas não identificadas (BERGDOLL,1990 e SU & WONG, 1993).

Utilizando-se o método de detecção de enterotoxinas ELISA, tem-se verificado que parte das linhagens consideradas produtoras de enterotoxinas não identificadas, na realidade são produtoras de pequenas

quantidades das enterotoxinas conhecidas, não sendo detectadas pelos métodos de difusão em gel (KOKAN & BERGDOLL, 1987 e PEREIRA et al, 1991). Entretanto, mesmo que estas linhagens tenham se apresentado positivas pelo método ELISA, o uso de tais métodos é caro e em geral não disponível em países em desenvolvimento (PEREIRA et al, 1991).

Tendo em vista a epidemiologia e patogenia de *Staphylococcus aureus*, bem como a importância do leite e produtos lácteos na alimentação humana, inúmeros estudos têm sido conduzidos com o objetivo de verificar a ocorrência de linhagens enterotoxigênicas nestes produtos.

3.4. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em leite e derivados

Diversos estudos realizados no Brasil e exterior mostram uma constante contaminação por *Staphylococcus aureus* no leite cru destinado à pasteurização, produção de diferentes produtos lácteos, bem como nos produtos acabados.

Em seu estudo, ARAÚJO (1984) verificou que, das 100 amostras de leite cru coletadas a partir de 5 linhas de distribuição de leite existentes em Pirassununga, 50% apresentaram-se positivas para *Staphylococcus aureus*, sendo que as contagens variaram de 30 - $1,1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Apenas uma das amostras positivas continha mais que 10^5 UFC/ml desta bactéria, valor tido como limite, a partir do qual o alimento poderia causar intoxicação alimentar estafilocócica. Foi

isolada 1(1,0%) única linhagem produtora de enterotoxina do tipo B, proveniente de amostra que apresentou contagens entre $10^2 - 10^3$ UFC/ml.

ABO-ELNAGA et al (1985) examinaram 50 amostras de leite de vaca cru e observaram que a contagem de *Staphylococcus aureus* foi baixa, tendo sido encontrado somente 80 UFC/ml.

A elevada prevalência de *Staphylococcus aureus* como agente etiológico da mastite, tem levado inúmeros pesquisadores a realizarem estudo sobre a ocorrência do referido microrganismo, em amostras de leite de vacas que apresentem mastite clínica ou sub-clínica.

O estudo de ABBAR & MOHAMMED (1986), baseou-se na análise de 165 amostras de leite cru, provenientes de 142 vacas mastíticas de diferentes localidades de Ninevah. Um total de 79 linhagens de estafilococos foram isoladas, e destas, 53 foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, as quais apresentaram resistência a antibióticos como a penicilina (47,17%), estreptomicina (20,75%), eritromicina (9,43%) e cloranfenicol (5,66%). Do total de *Staphylococcus aureus* isolados, 5 linhagens produziram enterotoxina estafilocócica C e 2 produziram enterotoxina estafilocócica A.

Dentre 62 amostras de leite cru procedentes das 40 fêmeas reagentes à prova do "Califórnia Mastitis Test", o *Staphylococcus aureus* foi isolado a partir de 19 (30,65%). As 19 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas foram

submetidas a testes de produção de enterotoxinas, de modo que os resultados evidenciaram 3(15,79%) linhagens produtoras de enterotoxina do tipo C (SCHOCKEN-ITURRINO et al, 1986).

FURLANETTO et al (1987) investigaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 56 amostras de leite tipo B "in natura", provenientes de vacas com mastite sub-clínica de rebanhos da região de Barretos e observaram que 25 (44,6%) revelaram-se positivas para linhagens de *Staphylococcus aureus*, 2 (8,0%) das quais apresentaram-se como produtoras, concomitantemente, de enterotoxinas dos tipos A e E.

O estudo realizado por NADER FILHO et al (1988c), consistiu na análise de 59 amostras de leite cru de vacas com mastite sub-clínica, coletadas em 17 propriedades produtoras de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto. O *Staphylococcus aureus* foi isolado a partir de 32(54,2%) amostras. Das linhagens isoladas, somente 1 (1,3%) revelou-se produtora de enterotoxina do tipo B.

Além destas pesquisas, FREITAS & MAGALHÃES (1990) também realizaram estudo a fim de verificar a enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite. Neste estudo foram analisadas 546 amostras de leite cru, procedentes de 86 rebanhos produtores de leite tipo C, tendo sido isolado *Staphylococcus aureus* de 229(41,94%) amostras. A partir de 93 linhagens de *Staphylococcus aureus* selecionadas, apenas uma apresentou produção de enterotoxina do tipo A.

Por outro lado, MESQUITA et al (1988) analisaram 63 amostras de leite cru, provenientes de vacas sadias da bacia leiteira da região de Goiânia e isolaram *Staphylococcus* coagulase positivos em 45 amostras (71,4%), de modo que as contagens variaram de $1,9.10^1$ UFC/ml - $8,9.10^4$ UFC/ml, com valor médio de $5,3.10^3$ UFC/ml.

Segundo SHINAGAWA et al (1988), a população de *Staphylococcus aureus* presente em 575 amostras de leite cru não variou significativamente desde a ordenha até o tanque de estocagem na indústria de laticínios (10^3 - 10^4 UFC/ml). Entretanto, 52 (36,6%) das 142 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite cru produziram enterotoxinas estafilocócicas.

Durante sua pesquisa, BECKER et al (1989) examinaram 444 cocos Gram positivos, catalase positivos, isolados do leite procedente de rebanhos bovinos da região da Bavária, Alemanha. Foram detectadas 387 linhagens de *Staphylococcus aureus* e 57 culturas de outros Micrococcaceae. Apenas 5% das 100 linhagens de *Staphylococcus aureus* testadas produziram enterotoxinas.

SANTOS et al (1981) analisaram amostras de leite cru e pasteurizado utilizadas para a produção de queijo tipo "Minas". De um total de 49 amostras de leite pasteurizado analisadas, 3 apresentaram-se contaminadas com *Staphylococcus aureus* em níveis de $(\log_{10})3$ a $(\log_{10})4,3$ /ml. Quanto à presença do microrganismo em leite cru, das 75 amostras analisadas, obtiveram 46,9% positivas para *Staphylococcus*

aureus, de modo que as contagens variaram de $(\log_{10})3,48$ - $(\log_{10})5,99$ UFC/ml.

Visando mostrar que o leite de vaca é uma fonte de *Staphylococcus aureus*, KAYIHURA et al (1987), examinaram 201 amostras de leite cru procedentes da Cooperativa de Cremes Kenya, tendo sido isoladas 120 culturas de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas, das quais 83 produziram enterotoxina estafilocócica A. Das 99 amostras de leite pasteurizado analisadas, somente 3 apresentaram *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina estafilocócica A.

NADER FILHO et al (1988a) avaliaram as características microbiológicas do leite tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento e, de um total de 20 amostras de leite pasteurizado, 20% apresentaram-se contaminadas com *Staphylococcus aureus* e, portanto, fora dos padrões legais. Dando continuidade ao estudo sobre as características microbiológicas do leite tipo B, NADER FILHO et al (1988b), além de isolar 99 linhagens de *Staphylococcus aureus* a partir de 20 amostras de leite tipo B "in natura" e evidenciar a ocorrência de linhagens (2 ou 2,0%) produtoras de enterotoxina B, estes autores também verificaram que o número de *Staphylococcus aureus* variou de $1,16.10^2$ UFC/ml - $3,24.10^3$ UFC/ml, sendo que a média foi $1,19.10^3$ UFC/ml. NADER FILHO et al (1988) pesquisaram ainda a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 20 amostras de leite pasteurizado tipo B, coletadas no comércio varejista de Jaboticabal e

verificaram baixa ocorrência do microrganismo no produto, já que somente 1(5,0%) amostra apresentou-se contaminada. Já em 1989 os mesmos autores examinaram um total de 22 amostras de leite tipo C "in natura," provenientes de tanques de estocagem de uma usina de beneficiamento e verificaram, que 9 (40,1%) revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* (NADER FILHO et al, 1989).

O estudo realizado por NASCIMENTO et al (1991), a partir de 60 amostras de leite pasteurizado dos tipos B, C e reconstituído, coletados em Piracicaba, revelou que dentre 30 amostras do leite tipo B e 30 amostras do leite tipo C analisadas, 6,7% e 3,3%, respectivamente, estavam fora das especificações legais vigentes para *Staphylococcus aureus*.

De acordo com CERQUEIRA-CAMPOS et al (1983), de um total de 60 amostras de leite pasteurizado tipo especial (3,2% de gordura) coletados na cidade de São Paulo, 5(8,3%) apresentaram-se contaminadas com *Staphylococcus aureus*.

Segundo SILVEIRA et al (1988), de um total de 72 amostras de leite tipo C coletadas na cidade de São Paulo, 2 (2,77%) apresentaram linhagens de *Staphylococcus aureus* potencialmente capazes de produzir enterotoxina danosa à saúde humana.

RAIMUNDO et al (1988) examinaram amostras de nata de leite, leite em pó integral e leite pasteurizado tipo C, quanto à presença de diferentes microrganismos, dentre eles o *Staphylococcus aureus*. Foram coletadas 30 amostras de cada produto em supermercados da cidade do Rio de Janeiro, de

modo que os resultados mostraram ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 56,7% das amostras de leite pasteurizado tipo C e 13,3% das amostras de nata.

O estudo realizado por UMOH et al (1985), enfatizou a contaminação de leite em pó infantil com linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus*. Foram analisadas 114 amostras de leite em pó infantil, coletadas no dia de abertura da lata. Os resultados apresentaram contagens médias de *Staphylococcus* de $1,0 \cdot 10^2$ UFC/g, tendo sido isoladas 123 culturas de *Staphylococcus aureus*. Ainda que o número de *Staphylococcus aureus* deva ser no mínimo 10^6 UFC/g para apresentar risco de intoxicação alimentar, estes autores consideraram a fórmula infantil analisada, potencialmente perigosa quanto à intoxicação estafilocócica, uma vez que o leite é reconstituído em água quente ou fria e leva algumas horas antes da alimentação das crianças, podendo, neste período de tempo, haver multiplicação e produção de enterotoxinas em níveis suficientes para provocar intoxicação.

A literatura tem notificado a ocorrência de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas em queijos produzidos comercialmente e algumas vezes para consumo doméstico. O uso do leite cru na produção de queijos, falha na pasteurização do leite ou equipamento, contaminação cruzada ou pós-processamento, são fatores que contribuem para a contaminação deste produto lácteo (ZOTTOLA & SMITH, 1991).

De acordo com os resultados obtidos por GALLO (1978), o número de *Staphylococcus aureus* presentes em 3 amostras de queijo "Minas Frescal" coletadas em Piracicaba variou de $3,3.10^5$ a $3,7.10^5$ UFC/g.

SILVA (1980) avaliou a qualidade microbiológica do queijo "Minas Frescal" consumido na cidade do Rio de Janeiro e observou que, das 60 amostras analisadas, 23 (38,33%) mostraram contagens de *Staphylococcus aureus* maiores que 10^3 UFC/g e, portanto, fora dos padrões legais. FURLANETTO et al (1983), em experimento semelhante, realizado no município de São Paulo, analisaram 30 amostras de queijo "Minas Frescal" quanto à presença de *Staphylococcus aureus* e outros patógenos. A contagem de *Staphylococcus aureus* variou de $1,52.10^2$ - $1,2.10^5$ UFC/g. Das 10 amostras positivas para o referido microrganismo, 9(90%) encontraram-se acima do máximo permitido para essa bactéria, ou seja, acima de 10^3 UFC/g.

Além destes, o estudo realizado por NASCIMENTO et al (1985), também detectou a presença de *Staphylococcus aureus* a partir de amostras de queijo coletadas na cidade de Ouro Preto. De um total de 51 amostras de queijo "Minas Frescal", 62,75% apresentaram contagens entre 10^5 - 10^7 UFC/g. Em relação às contagens de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*, 90,20% das amostras examinadas não atenderam aos padrões estabelecidos pela resolução 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

A presença de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "Minas" foi pesquisada por MANDIL et al (1982), os quais

examinaram 99 amostras do referido queijo, coletadas no comércio varejista de Belo Horizonte. Os resultados mostraram que 65 (65,7%) amostras estavam contaminadas com *Staphylococcus aureus*, em níveis variando de 10^1 UFC/g a mais de 10^5 UFC/g. Foram selecionadas 91 culturas de *Staphylococcus aureus* para o teste de produção de enterotoxinas dos tipos A, B, C, D e E. Destas, 20 (21,97%) produziram enterotoxinas, de modo que 6, 6, 1, 1 e 6 linhagens produziram, respectivamente, enterotoxinas dos tipos A, B, C, D e E.

No estado do Mato Grosso, assim como em inúmeros outros estados brasileiros, o queijo "Minas" ainda é produzido artesanalmente, com leite sem refrigeração ou pasteurização. Neste contexto, WENDAP & ROSA (1993) realizaram pesquisa referente à ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 5 amostras de queijo "Minas", coletadas no município de Cuiabá. De acordo com os resultados, o número médio do referido patógeno foi de $7,8.10^5$ UFC/g. Os autores atribuíram esse elevado crescimento tanto à matéria-prima quanto ao processo de fabricação e armazenamento, principalmente devido ao manuseio excessivo sem os devidos cuidados higiênicos.

Em Guadalajara, ESCARTÍN et al (1982) investigaram a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 86 amostras de queijos frescos, elaborados a partir de leite de vaca não pasteurizado e observaram que 22% das amostras continham menos que 10^3 UFC/g, 35% apresentaram mais de 10^6

S. aureus/g, sendo que o número médio encontrado foi 3.10^5 *S. aureus*/g.

DANGLA et al (1985) examinaram 205 amostras de queijos brancos, frescos, elaborados a partir de leite cru, procedentes de 6 zonas rurais da Costa Rica e observaram que todas as amostras continham *Staphylococcus aureus* termonuclease positivos e mais de 71% das mesmas apresentaram contagens do microrganismo maiores que 10^4 UFC/g. Estes autores concluíram que fatores ambientais como a umidade relativa, qualidade microbiológica da água e temperatura, bem como aqueles relacionados com o produto elaborado (pH, atividade de água e acidez), não podem ser descartados quando se deseja avaliar o crescimento dos microrganismos presentes no queijo e que, provavelmente, os resultados obtidos devem-se à interação de todos estes fatores.

A contagem bacteriana total em 107 amostras de queijo Árabe obtido na cidade de Bagdá foi maior que 10^6 UFC/g, sendo que 50% das amostras apresentaram mais de 10^4 *S. aureus*/g. Das 324 linhagens isoladas, o *Staphylococcus aureus* representou 58% do total. A partir de 91 linhagens do *Staphylococcus aureus*, testadas quanto à produção de enterotoxinas, observou-se que 65 mostraram-se enterotoxigênicas. As enterotoxinas A, B e C foram produzidas, respectivamente, por, 1, 40 e 10 linhagens. A enterotoxina estafilocócica B esteve sempre presente nos 14 isolados que produziram mais de uma enterotoxina, de modo que

nenhuma cultura produziu enterotoxina D ou E somente (NOUR, et al, 1986a).

Staphylococcus aureus também foi isolado a partir da análise de 100 amostras de queijo Domiati obtidas na região do Cairo. A contagem de *Staphylococcus aureus* foi menor que 10^3 UFC/g em 9 amostras e maior do que 10^6 UFC/g em 17 amostras. Das 60 colônias típicas selecionadas ao acaso, a partir do meio Baird-Parker, somente 8, 1 e 2 produziram, respectivamente, enterotoxina A, enterotoxina B e enterotoxina A e B conjuntamente (NOUR et al, 1991).

Em Fayoum, Egito, TAWFEK et al (1988) examinaram 100 amostras de queijo Kareish quanto à presença de bactérias patogênicas. O *Staphylococcus aureus* foi isolado de 66 amostras, mas nenhuma linhagem isolada produziu enterotoxina A, B, C ou D.

De acordo com os estudos citados acima, verifica-se que linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* estão frequentemente presentes em leite cru, leite pasteurizado e queijos, representando risco potencial de intoxicação estafilocócica aos consumidores.

Os surtos de origem alimentar ocorrem tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento e têm se tornado o problema de saúde pública mais amplamente difundido no mundo contemporâneo (SUDHAKAR et al, 1988).

Uma vez estabelecida a etiologia do *Staphylococcus aureus*, logo este microrganismo se tornou

reconhecido como a maior causa de intoxicação alimentar em vários países (DELAZARI et al, 1978).

As intoxicações alimentares causadas por *Staphylococcus aureus* continuam entre as maiores causas de envenenamento alimentar nos Estados Unidos da América (E.U.A.) e em países onde existe uma estatística confiável (GENIGEORGIS, 1989; HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989 e GILMOUR & HARVEY, 1990). No período de 1983 - 1987 BEAN et al (1990), verificaram que o *Staphylococcus aureus* foi o segundo maior causador de surtos de envenenamento alimentar nos E.U.A., tendo sido notificados 2892 casos. Estes autores enfatizaram que os números relacionados em seu levantamento representam uma pequena fração do que verdadeiramente ocorre, já que muitos casos não são notificados aos órgãos competentes. No Canadá, durante o período de 1973-1977, o *Staphylococcus aureus* esteve entre os principais patógenos responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, tendo causado 143 dos casos notificados, concordando com o que ocorre nos E.U.A. e Europa, onde o *Staphylococcus aureus* está entre os 3 principais patógenos responsáveis por intoxicações alimentares (TODD, 1983a e TODD, 1983b).

Inúmeros alimentos têm sido responsabilizados por surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, estando o leite e o queijo frequentemente envolvidos (DELAZARI et al ,1978).

Os surtos provenientes do leite e produtos pasteurizados geralmente são devidos a tratamento térmico

inadequado, contaminação pós-tratamento térmico e/ou estocagem inadequada. Já os produtos produzidos a partir de leite cru, como o leite desidratado e alguns tipos de queijo têm sido responsabilizados como os mais importantes veículos de surtos de intoxicações estafilocócicas (BRYAN, 1983 e ZOTTOLA & SMITH, 1991).

Nos E.U.A., foram notificados surtos de envenenamento alimentar estafilocócico devido a leite líquido, leite desidratado, queijo, manteiga e leite achocolatado. No Canadá, em 1979, ocorreu um surto devido ao queijo suíço e, na Holanda, em 1980, foi notificado um surto devido a pudim de baunilha (GILMOUR & HARVEY, 1990).

Em 1958, foi notificado um surto de intoxicação alimentar estafilocócica devido ao consumo de queijo Cheddar Americano, envolvendo 200 trabalhadores de uma instituição estatal em Iowa (HENDRICKS et al, 1959).

BRYANT et al (1988) verificaram que o queijo Tortellini foi o alimento incriminado de causar gastroenterite em cerca de 80 pessoas em uma conferência literária na Califórnia. O número de *Staphylococcus aureus* presente em amostra de queijo Tortellini suspeito de causar a doença foi $6,0 \cdot 10^7$ UFC/g e as colônias testadas quanto à produção de enterotoxinas, produziram tanto enterotoxina do tipo A como do tipo B.

O *Staphylococcus aureus* também foi considerado como possível causador de um surto na Índia, o qual atingiu 240 pessoas e envolveu o consumo de queijo. Foram analisadas

35 amostras do queijo suspeito e o único patógeno detectado foi o *Staphylococcus aureus*, que esteve presente em 10 (28%) das amostras examinadas (BAKHEIT et al, 1991).

O leite pasteurizado também esteve envolvido em um surto de intoxicação alimentar estafilocócica. Cerca de 850 estudantes de uma escola dos E.U.A. ficaram doentes, apresentando vômitos e diarreia após 3 - 4h da ingestão de leite achocolatado 2%. Ainda que nenhum estafilococos tenha sido detectado no leite achocolatado pasteurizado, a análise de 12 amostras do leite envolvido no surto, revelou a presença de enterotoxina estafilocócica A, em quantidades que variaram de 94 - 184 ng/280ml. Sendo assim, os sintomas, juntamente com a presença da enterotoxina A, enquadraram a doença como um típico envenenamento alimentar estafilocócico (EVENSON et al, 1988).

ARMIGO et al (1957) descreveram uma série de 19 surtos de gastroenterite envolvendo 775 crianças de escolas de San Juan, em Porto Rico. O estudo epidemiológico indicou o leite em pó contaminado com enterotoxina estafilocócica, como causa provável da doença.

No Egito, em 1986, ocorreu uma série de surtos de intoxicação estafilocócica devido ao consumo de leite em pó desnatado. Ainda que os testes não tenham revelado a presença de estafilococos, as enterotoxinas A e B foram detectadas nas amostras envolvidas nos surtos (EL-DAIROUTY, 1989).

Paralelamente às pesquisas referentes aos problemas de saúde pública causados pelas intoxicações alimentares, tem-se estudado o impacto econômico dos surtos. SUDHAKAR et al (1988) estimaram o custo econômico de um surto de intoxicação estafilocócica envolvendo 100 pessoas da cidade de Hyderabad e determinaram que o total de gastos foi de 1048 dólares. Os autores enfatizaram que a razão de casos notificados de doenças de origem alimentar, em países em desenvolvimento, está em torno de 25:1 a 100:1, de modo que o custo da referida doença poderia ser fenomenal.

Nos E.U.A., estima-se que o custo anual dos casos de diarreia devido a surtos alimentares, atinja cerca de 5 a 17 bilhões de dólares em cuidados médicos e perda de produtividade (INSTITUTE of Food Technologists, 1988).

Infelizmente, no Brasil, raramente são efetuados registros de surtos de toxinfecção alimentar e, quando ocorrem casos desta natureza, o tratamento é meramente sintomático, não sendo acompanhado de investigação adequada para determinar sua causa (UBOLDI-EIROA, 1989).

Apenas recentemente alguns surtos de intoxicação estafilocócica têm despertado o interesse de autoridades competentes em algumas cidades brasileiras (CARMO & BERGDOLL, 1990).

SABIONI et al (1988) notificaram um caso de intoxicação alimentar estafilocócica, devido ao consumo de queijo "Minas Frescal" na cidade de Ouro Preto. Os sintomas predominantes foram náuseas, diarreia e dores abdominais, de

modo que o período de incubação foi em média de uma 1h. Realizou-se análise microbiológica em 1 amostra de queijo "Minas Frescal", suspeito de ter causado intoxicação alimentar em uma família de 4 pessoas. A contagem microbiana revelou que o alimento envolvido apresentava $9,3 \cdot 10^7$ *S. aureus*/g. A partir de 10 linhagens de *Staphylococcus aureus* selecionadas, 3, 2, 2 e 1 produziram, respectivamente, somente enterotoxina A, enterotoxina A e B, enterotoxina A e D e enterotoxina A, D e E. Apenas 2 das linhagens testadas não produziram qualquer tipo de enterotoxina. O alto nível de contaminação do alimento, a presença de linhagens enterotoxigênicas juntamente com os sintomas observados no surto, indicaram que o *Staphylococcus aureus* tenha sido o responsável pela intoxicação.

Nos últimos dois ou três anos, têm ocorrido inúmeros surtos de intoxicação alimentar estafilocócica na região de Belo Horizonte, sendo que, na maioria dos casos, os alimentos envolvidos são queijos brancos e bolos. CARMO & BERGDOLL (1990) investigaram 18 surtos de toxinfecção alimentar em Belo Horizonte, ocorridos entre 1988 - 1989, sendo 10 a partir de queijo branco e 8 a partir de bolos confeitados. O número de *Staphylococcus* encontrados nas amostras de queijo branco envolvidas nos 10 surtos estudados, variou de $1,0 \cdot 10^4$ - $2,8 \cdot 10^8$ UFC/g, de modo que apenas as linhagens isoladas a partir de amostras de queijos provenientes de 2 surtos não apresentaram produção de enterotoxina estafilocócica. O fato dos *Staphylococcus* terem

sido isolados dos alimentos em altos níveis e produzirem enterotoxinas confirmaram este patógeno como agente causador da doença.

PEREIRA et al (1991) também notificaram um surto de intoxicação alimentar causado pelo consumo de queijo "Minas" produzido com leite cru. O queijo foi consumido por 7 pessoas em Belo Horizonte, as quais apresentaram, após cerca de 4h, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e sudorese. As contagens revelaram $2,0 \cdot 10^7$ *Staphylococcus aureus*/g de queijo. A partir de 5 linhagens selecionadas, verificou-se que todas produziram enterotoxina do tipo B.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras utilizadas no presente estudo foram de leite bovino cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", coletadas quinzenalmente em Piracicaba, durante o período de novembro de 1991 a março de 1992.

Durante o referido período, foram realizadas sete coletas, nas quais foram analisadas 18 amostras de cada um dos produtos e mais 1 amostra de leite cru e 1 de leite pasteurizado tipo C, como ensaio preliminar, totalizando 56 amostras.

As amostras de leite cru provenientes de 6 produtores distintos (M, N, O, P, Q e R), foram obtidas junto à Cooperativa Agropecuária de Piracicaba em embalagens plásticas de 1000ml, enquanto as 6 marcas de queijo "Minas Frescal" (A, B, C, D, E e F) e as 5 marcas de leite pasteurizado tipo C (G, H, I, J e L), foram adquiridas em suas embalagens originais a partir de estabelecimentos comerciais de grande, médio e pequeno porte.

As amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", foram acondicionadas em

recipientes isotérmicos contendo gelo picado e transportadas imediatamente para o laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", a fim de se proceder as análises.

4.2. Detecção, isolamento e identificação

Tomou-se 20g de queijo "Minas Frescal" ou 20ml de leite cru e leite tipo C de cada amostra coletada, os quais foram diluídos até 10^{-6} e homogeneizados adequadamente em água peptonada. O material diluído foi inoculado em duplicata em meio ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito e incubado entre $37^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ por 24-48h. Após período de incubação, as placas de Petri contendo entre 20-200 colônias foram submetidas à contagem em contador de colônias do tipo "Quebec".

Foram selecionadas 4-5 colônias típicas de cada produto amostrado (colônias que sobre o ágar Baird-Parker apresentaram-se circulares, lisas, pretas e brilhantes, com 0,5-3,0mm de diâmetro, envoltas ou não por zona opaca e externamente a esta, envoltas ou não por zona translúcida), as quais foram transferidas para caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI) e ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI). Este último meio de cultivo foi utilizado para a manutenção das culturas isoladas.

Os isolados Gram positivos que se apresentaram como cocos agrupados em forma de cachos, foram considerados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e submetidos a testes bioquímicos, os quais auxiliaram na identificação da espécie.

O número de *Staphylococcus aureus* presente nas diferentes amostras analisadas, foi obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g ou ml} = \text{fator de diluição} \times \text{n}^{\circ} \text{ de colônias presentes} \times \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias positivas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias testadas}}$$

4.2.1. Testes bioquímicos para identificação

4.2.1.1. Teste da catalase (SMIEBERT, 1981)

As colônias isoladas em ágar BHI foram semeadas em placas de Petri contendo PCA ("Plate Count Ágar") e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por 24-48h. Após o período de incubação, adicionou-se algumas gotas de solução de água oxigenada a 3%. As colônias catalase positivas produziam bolhas de oxigênio, após alguns segundos.

4.2.1.2. Teste da digestão da gelatina (SMIEBERT, 1981)

As colônias isoladas em ágar BHI foram semeadas em PCA, contendo 0,4% de gelatina e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por

24-48h. Após o período de incubação, adicionou-se o reagente precipitante de gelatina (HgCl_2 a 15% + HCl a 20% em partes iguais). As colônias gelatinase positivas apresentaram zonas translúcidas ao redor da semeadura, depois de alguns minutos.

4.2.1.3. Teste da digestão de lecitina (SMIEBERT, 1981)

A presença da enzima lecitinase foi verificada observando-se a digestão da lecitina presente em gema do ovo, após incubação das diferentes amostras por 24-48h a $37^\circ\text{C} \pm 1,0$ em ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito. As colônias lecitinase positivas apresentavam halo de hidrólise ao redor da semeadura.

4.2.1.4. Teste de hemólise (SMIEBERT, 1981)

As colônias isoladas em ágar BHI foram semeadas em ágar sangue de cavalo a 5% e incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1,0$ por 24-48h. As colônias beta-hemolíticas apresentavam halo incolor ao redor da colônia, evidenciando a lise completa dos eritrócitos.

4.2.1.5. Teste da oxidação e fermentação da glicose e do manitol (SMIEBERT, 1981)

Para realizar os testes de oxidação e fermentação de carboidratos, as colônias isoladas em ágar BHI foram inoculadas em PBB ("Purple Broth Base") contendo 1% de glicose e 1% de manitol (esterilizado a $121^{\circ}\text{C}/3\text{min}$) individualmente. Os tubos de ensaio preparados para o teste de oxidação dos carboidratos foram incubados a $37^{\circ}\text{C}\pm 1,0$ por 18-24h. Os tubos de ensaio, referentes ao teste de fermentação dos carboidratos, foram acondicionados em jarra GasPak, juntamente com uma solução de 0,5g de CaCO_2 + 2,5ml de água destilada + 2,5ml de HCl (0,1N), a fim de se conseguir anaerobiose. O material assim preparado foi incubado a $37^{\circ}\text{C}\pm 1,0$ por 5 dias.

Após o período de incubação, as colônias capazes de oxidar e/ou fermentar a glicose e/ou manitol, alteravam a coloração inicial do meio de cultivo, o qual passava da cor púrpura para amarelo.

4.2.1.6. Teste de coagulase (ICMSF, 1984)

Tomou-se 0,2ml de cada cultura em caldo BHI (previamente incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1,0$ por 24h), 0,5ml de plasma humano e adicionou-se a tubo de ensaio esterilizado (o plasma humano utilizado neste estudo foi obtido de sangue coletado em laboratório de análises clínicas, o qual foi centrifugado

e refrigerado por uma noite antes do uso). Os tubos foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por 4h e examinados para a coagulação do plasma. Os tubos foram reincubados e examinados após 24 h de incubação.

O grau de coagulação do plasma foi verificado de acordo com a seguinte escala (SPERBER & TATINI, 1975):

- teste negativo: não se observa a formação de coágulo de fibrina;
- teste positivo (1+): aparecem coágulos muito pequenos e desorganizados;
- teste positivo (2+): aparece um coágulo pequeno e organizado;
- teste positivo (3+): aparece um coágulo grande e organizado e
- teste positivo (4+): todo o conteúdo do tubo aparece coagulado, de modo que o coágulo não se desprende quando o tubo é invertido.

4.2.1.7. Teste de termonuclease (LACHICA et al, 1971)

Inicialmente, toda a superfície de um dos lados de lâminas de microscopia secas e limpas (25 x 75mm), foi coberta com cerca de 3ml de ágar DNA-azul de toluidina. Após a solidificação do ágar, foram feitos 10 orifícios em cada lâmina, com cerca de 2mm de diâmetro, empregando-se para tal,

tubos capilares esterilizados adaptados a uma trompa de vácuo. Em seguida, utilizando pipeta de Pasteur, foram adicionados em cada orifício, cerca de 10 µl das suspensões de células em caldo BHI, aquecidas por 15min. em banho-maria em ebulição e depois resfriadas à temperatura ambiente.

Após o preenchimento dos orifícios, as lâminas foram colocadas no interior de placas de Petri (18 x 145mm) com um pedaço de algodão umedecido (câmara úmida) e incubadas a 37°C±1,0 por 4h. A reação positiva, ou seja, presença de nuclease termorresistente se caracterizou pela formação de um halo rosa de no mínimo 1,0mm ao redor dos orifícios.

4.2.1.8. Prova do fator "clumping"

(PROBAC DO BRASIL)

Nesta prova, utilizaram-se dois reagentes que compõem o kit, ou seja, o reagente "Staphy-test R" e o "Staph-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. Os frascos contendo o "Staph-test R" e o "Staph-test C" foram agitados antes de se proceder os testes, a fim de ressuspender as hemácias depositadas.

Dentre as colônias suspeitas isoladas em ágar BHI, selecionou-se 1 colônia de cada vez, a qual foi suspensa

numa gota de "Staph-test R" sobre uma lâmina de microscópio, utilizando-se uma alça de platina. Procedeu-se da mesma forma com o "Staph-test C", para a mesma colônia.

Imprimiu-se movimento de rotação à lâmina e observou-se contra fundo escuro e sob boa iluminação. Quando a reação de aglutinação apresentou-se fortemente positiva em 5s no "Staph-test R" e negativa no "Staph-test C", caracterizou-se a colônia como sendo de *Staphylococcus aureus*. Se a reação apresentou-se negativa em 5s para os dois reagentes, a colônia não foi considerada como de *Staphylococcus aureus*.

4.3. Manutenção das linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas

As linhagens de *Staphylococcus aureus*, isoladas a partir dos diferentes produtos lácteos analisados, foram submetidas ao processo de liofilização, para a sua manutenção.

4.4. Produção de enterotoxinas estafilocócicas (ICMSF, 1984)

A produção de enterotoxinas por colônias de *Staphylococcus aureus*, isoladas dos produtos lácteos em estudo, foi efetuada pelo método de cultura em saco.

O preparo do frasco para a produção de enterotoxina foi efetuado por meio de saco de celofane lavado em água e introduzido em erlenmeyer de 250ml. Foram transferidos para o saco de celofane 100ml de caldo BHI em dupla concentração. Após introdução no saco de celofane, fechou-se a extremidade com barbante. O frasco, assim preparado, foi fechado com algodão e esterilizado a 121°C por 15 minutos.

Paralelamente, 2 tubos de cultura de *Staphylococcus aureus*, incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por 24h em ágar BHI inclinado, receberam 1ml de solução tampão salina fosfatada (pH 7,4) para resuspensão das células bacterianas, após o que, as suspensões contidas nos dois tubos de ensaio foram transferidas assepticamente para o interior do erlenmeyer (fora do saco de celofane), juntamente com mais 18ml de solução tampão salina fosfatada.

O frasco assim preparado foi incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por 24h em "Shaker".

Após incubação, a porção líquida fora do saco de diálise, foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 17.210g por 15min., em tubos de centrífuga de 50ml esterilizados. O sobrenadante foi recuperado, transferido para frasco esterilizado, adicionando-se 2-3 gotas de metiolate 1:5000, após o que foi congelado a -18°C e mantido a esta temperatura até a prova de caracterização da toxina.

4.5. Detecção e caracterização das enterotoxinas (ICMSF, 1984)

O método utilizado foi o de placa de sensibilidade ótima, ou seja, prova de imunodifusão dupla em gel de ágar (ICMSF, 1984).

As enterotoxinas e anti-enterotoxinas padrões utilizadas nestas análises foram as do tipo A, B, C₂ e D, gentilmente fornecidas pelo Prof. Merlin S. Bergdoll do "Food Research Institute", Universidade de Wisconsin, Estados Unidos da América.

Esses reagentes foram recebidos liofilizados e a sua reconstituição foi feita, seguindo-se as instruções que acompanhavam os referidos padrões, como mostra a Tabela 1. Depois de reconstituídos, os reagentes foram distribuídos em tubos de ensaio esterilizados e conservados à temperatura de -10°C.

A prova de imunodifusão dupla em gel de ágar foi realizada aplicando-se as enterotoxinas e anti-enterotoxinas padrões A, B, C₂ e D em placas de Petri individuais (12 x 52mm) contendo 3,0ml de ágar 1,2% (preparado com solução tampão salina fosfatada 0,02M, pH 7,4 e metiolate na proporção de 1:10000) de acordo com molde padrão (ROBBINS et al, 1974), como mostram as Figuras 1 e 2.

Após inoculação, as placas de Petri foram incubadas a 37°C±1,0 por 16h em câmara úmida.

TABELA 1. Enterotoxinas e anti-enterotoxinas padrões e respectivas diluições empregadas nos experimentos.

Reagente	Tipo	Código	Diluições e concentrações utilizadas
Enterotoxinas	A	AT-12	4 µg/ml
	B	BT-10	4 µg/ml
	C ₂	C ₂ T-10	4 µg/ml
	D	DT-11	4 µg/ml
Anti-enterotoxinas	A	AS - 16	1:36
	B	BS - 202	1:30
	C ₂	C ₂ S - 222	1:30
	D	DS-303	1:8

Fonte: ROBBINS et al (1974)

FIGURA 1. Desenho esquemático de molde utilizado para fazer perfurações no ágar em placa de sensibilidade ótima.

Para exame do material, o ágar foi lavado com água destilada e 2 a 3ml de ácido fosfórico (0,1M) foram adicionados sobre a superfície do mesmo. Após 2 a 3 minutos, as placas de Petri foram examinadas em contador de colônias do tipo "Quebec". Este método provê que cada orifício contendo amostra desconhecida seja adjacente a uma linha de precipitação controle, de modo que todos os resultados positivos sejam confirmados pela coalescência com a linha de precipitação controle (Figura 2).

4.6. Acidez titulável

A acidez titulável das amostras dos produtos lácteos analisados foi feita através da titulação da amostra com NaOH/10, até o ponto de viragem do indicador fenolftaleína. Os resultados foram expressos em % de ácido láctico/100ml ou g de amostra.

4.7. Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em peagâmetro digital Metronal, modelo E 120.

LEGENDA :

AE - Anti-enterotoxina

EP - Enterotoxina padrão

AM - Amostra

C - Linha controle

P - Resultado Positivo

FIGURA 2. Desenho esquemático da disposição da enterotoxina e anti-enterotoxina padrão, bem como das amostras testadas quanto à produção de enterotoxinas estafilocócicas, em placa de sensibilidade ótima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que, de um total de 56 amostras de produtos lácteos examinadas, 15 (26,32%) apresentaram-se contaminadas por *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao leite cru, os resultados revelaram que o *Staphylococcus aureus* ocorreu em 11(57,89%) das 19 amostras analisadas, sendo que as contagens variaram de $1,20.10^3$ - $7,4.10^5$ UFC/ml, como pode ser visto na Tabela 2. Foram isoladas 18 linhagens do *Staphylococcus aureus* a partir das amostras de leite cru, as quais não produziram nenhuma das enterotoxinas testadas, ou seja, enterotoxinas dos tipos A, B, C₂ e D.

Nesse estudo, a porcentagem de amostras de leite cru, positivas para o *Staphylococcus aureus* (57,89%), foi superior à encontrada por SANTOS et al (1981), SCHOCKEN-ITURRINO et al (1986), FURLANETTO et al (1987) e FREITAS & MAGALHÃES (1990).

Os estudos realizados por SCHOCKEN-ITURRINO et al (1986), FURLANETTO et al (1987) e FREITAS & MAGALHÃES (1990), envolveram a análise de 62, 56 e 546 amostras de leite cru provenientes de vacas mastíticas, sendo que,

destas, respectivamente, 19 (30,65%), 25 (44,60%) e 229 (41,94%) apresentaram-se contaminadas por *Staphylococcus aureus*.

NADER FILHO et al (1988c) realizaram estudo referente à presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru, provenientes de vacas com mastite clínica e/ou sub-clínica e observaram que 32(54,2%) das 56 amostras examinadas estavam contaminadas por este microrganismo. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde a partir de 19 amostras, 11(57,89%) estiveram contaminadas com *Staphylococcus aureus*.

ARAÚJO (1984), analisando 100 amostras de leite cru verificaram que 50(50,00%) revelaram-se positivas para *Staphylococcus aureus*, de modo que 48,00% das amostras positivas apresentaram contagens entre 10^3 a mais de 10^5 UFC/ml, enquanto no presente estudo 57,89% (11) das amostras de leite cru estiveram contaminadas por *Staphylococcus aureus*, em níveis que variaram de $1,20.10^3$ - $7,40.10^5$ UFC/ml. Por outro lado, SHINAGAWA et al (1988) examinaram 150 amostras de leite cru, das quais somente 52(34,7%) apresentaram-se contaminadas por *Staphylococcus aureus* em níveis de 10^1 - 10^3 UFC/ml e, portanto, valores menores do que aqueles verificados no presente estudo.

De acordo com NADER FILHO et al (1988b), as contagens de *Staphylococcus aureus* foram baixas ($1,16.10^2$ - $3,24.10^3$ UFC/ml) nas 20 amostras de leite tipo B "in natura" coletadas; entretanto, 20(100%) das amostras examinadas

apresentaram-se contaminadas com o referido microrganismo. Verifica-se, assim, que as contagens obtidas pelo estudo acima foram inferiores àquelas encontradas no presente estudo ($1,20.10^3 - 7,40.10^5$ UFC/ml), enquanto a frequência de amostras contaminadas com *Staphylococcus aureus* foi 42,11% maior do que a observada nesta pesquisa.

A porcentagem de amostras de leite cru contaminadas por *Staphylococcus aureus* no presente trabalho (57,89%) foi superior àquela encontrada por SANTOS et al (1981), que a partir de 78 amostras de leite cru, coletadas no Estado de Minas Gerais, obtiveram 46,9% contaminadas por *Staphylococcus aureus*. Os números do microrganismo obtidos por estes autores, a partir das amostras de leite cru, variaram de $3,01.10^3 - 9,77.10^5$ UFC/ml, concordando com os resultados revelados neste estudo, onde foram encontrados valores entre $1,23.10^3 - 7,40.10^5$ UFC/ml. A semelhança entre os resultados pode ser considerada significativa, já que nas duas pesquisas utilizou-se o meio de isolamento ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito.

MESQUITA et al (1988) também efetuaram pesquisa envolvendo análise microbiológica do leite cru. Estes autores analisaram 63 amostras de leite cru provenientes da bacia leiteira da região de Goiânia e detectaram o *Staphylococcus coagulase* positivo em 45 (71,40%) das amostras examinadas. Esta porcentagem de amostras positivas foi 13,51% maior do que aquela revelada no presente estudo (57,89%). Por outro lado, as contagens médias do *Staphylococcus coagulase*

positivo, encontradas por MESQUITA et al (1988), ou seja, $5,30.10^3$ UFC/ml, foram inferiores aos valores médios obtidos nesta pesquisa ($7,75.10^4$ UFC/ml).

Staphylococcus aureus não esteve presente em nenhuma das 19 amostras de leite pasteurizado tipo C examinadas no presente trabalho, enquadrando-se as mesmas nos padrões microbiológicos vigentes, que determinam a ausência de patógenos em leite pasteurizado. Tais resultados concordaram com aqueles obtidos por NADER FILHO et al (1989) que, analisando 66 amostras de leite tipo C provenientes da saída do pasteurizador, tanque de estocagem e saída do envase, em uma fábrica de laticínios, não encontraram contaminação por *Staphylococcus aureus*.

Em Piracicaba, NASCIMENTO et al (1991) examinaram 30 amostras de leite tipo C e verificaram que, somente 1(3,30%) amostra revelou-se contaminada por *Staphylococcus aureus*.

Além desse, inúmeros estudos têm detectado amostras de leite tipo C contaminadas por *Staphylococcus aureus*, discordando dos resultados obtidos neste trabalho, como é o caso da pesquisa realizada por SILVEIRA et al (1988), que a partir de 72 amostras do referido produto, encontrou 2(2,77%) contaminadas pelo microrganismo, enquanto VESSONI-PENNA et al (1986), analisando 50 amostras do leite tipo especial verificaram que 8(14,80%) apresentavam-se contaminadas por *Staphylococcus aureus*.

O estudo realizado por CERQUEIRA-CAMPOS et al (1983), detectou 5 (8,30%) amostras de leite tipo especial contaminadas por *Staphylococcus aureus*, a partir de 60 amostras coletadas na cidade de São Paulo.

No presente estudo, um total de 28 colônias típicas de *Staphylococcus aureus* foi isolado do meio ágar Baird-Parker, a partir de 6 amostras de leite pasteurizado tipo C; entretanto, nenhuma foi identificada como *Staphylococcus aureus*.

De acordo com BATISH et al (1989), o tratamento térmico do leite, contendo linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* fez com que a maior parte das linhagens sobreviventes perdesse características, tais como, capacidade de produzir coagulase, nuclease e enterotoxina.

Os mesmos autores, em 1990, dando continuidade ao estudo anterior, concluíram que o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* pode ser afetado por tratamentos térmicos sub-letais, simulando as condições de processamento do leite (BATISH et al, 1990). Estes autores recomendaram que as culturas de *Staphylococcus aureus* estressadas termicamente, devem ser repicadas várias vezes em meios ricos, como o caldo infusão de cérebro e coração, antes de serem submetidas aos testes de coagulase, nuclease termoe estável e produção de enterotoxina, a fim de que os microrganismos possam ser reativados e, então, expressem todas as suas características bioquímicas.

Embora a ausência do *Staphylococcus aureus* no leite pasteurizado seja considerada como resultado adequado em termos de saúde pública, EVENSON et al (1988) estudaram um surto de envenenamento alimentar causado por leite achocolatado e verificaram que, mesmo que os estafilococos não tenham sido detectados no leite pasteurizado, os sintomas apresentados pelos 850 estudantes acometidos pela doença, enquadravam-se como intoxicação causada por *Staphylococcus aureus*. Além disso, enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A e B foram detectadas nas amostras de leite achocolatado, em níveis suficientes para causar a doença.

Esses autores atribuíram a presença das enterotoxinas no leite achocolatado, adequadamente pasteurizado, a falhas no resfriamento do leite cru antes do processamento térmico.

Quanto ao queijo "Minas Frescal", os resultados deste estudo mostraram que o *Staphylococcus aureus* esteve presente em 4(22,22%) das 18 amostras analisadas e que as contagens variaram de $4,70.10^4$ - $1,38.10^6$ UFC/g, com média de $4,32.10^5$ UFC/g. Todas as amostras de queijo "Minas Frescal", contaminadas por *Staphylococcus aureus*, apresentaram números maiores que 10^3 UFC/g, estando fora dos padrões microbiológicos determinados pela portaria 01/1987, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, sendo consideradas, portanto, impróprias para o consumo humano(Tabela 2).

TABELA 2. Números de *Staphylococcus aureus* presentes em diferentes produtos lácteos coletados em Piracicaba, durante o período de dezembro de 1991 a março de 1992.

PRODUTO	AMOSTRA	DATA	Nº <i>S. aureus</i> (UFC/g ou ml)
LEITE CRU	M	02/12/91	$7,40.10^5$
	N	02/12/91	$6,92.10^4$
	O	20/01/92	$8,20.10^3$
	P	06/01/92	$3,12.10^3$
		06/03/92	$3,30.10^3$
		09/03/92	$3,27.10^3$
		09/03/92	$3,30.10^3$
	Q	02/12/91	$1,60.10^4$
		06/01/92	$3,32.10^3$
		20/01/92	$1,34.10^3$
	R	09/03/92	$1,20.10^3$
QUEIJO "MINAS FRESCAL"	A	02/12/91	$4,70.10^4$
	E	06/01/92	$1,68.10^5$
		03/02/92	$1,32.10^5$
		09/03/92	$1,38.10^6$

Comparando-se os resultados obtidos durante análise dos produtos lácteos examinados neste estudo verificou-se que o leite cru apresentou o maior número de amostras contaminadas por *Staphylococcus aureus* (11), seguido do queijo "Minas Frescal" (4), enquanto as amostras de leite pasteurizado tipo C não se mostraram contaminadas pelo patógeno. Por outro lado, as contagens médias do *Staphylococcus aureus* observadas nas amostras de queijo "Minas Frescal", contaminadas ($4,32.10^5$ UFC/g), foram maiores do que as encontradas em leite cru ($7,75.10^4$ UFC/ml).

TATINI et al (1971) verificaram, em seu estudo, que o *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico não se desenvolveu bem, crescendo em populações mistas em leite cru, que apresentavam altas contagens bacterianas. Quando o leite foi submetido a tratamento térmico, que reduziu as contagens bacterianas totais, o *Staphylococcus aureus* cresceu bem, indicando que a inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* em leite cru, com altas contagens bacterianas, provavelmente, foi devido ao grande número de organismos competidores.

As contagens do *Staphylococcus aureus* encontradas por FURLANETTO et al (1983), em 10 amostras de queijo "Minas Frescal", variaram de $1,52.10^2$ - $1,20.10^5$ UFC/g, enquanto os resultados do presente estudo, obtidos a partir de 4 amostras positivas para o *Staphylococcus aureus*, variaram de $4,70.10^4$ - $1,38.10^6$ UFC/g. A faixa de variação nas contagens do *Staphylococcus aureus*, presentes em 51

amostras de queijo "Minas Frescal", obtidas por NASCIMENTO et al (1985), ou seja , $1,0.10^2 - 4,7.10^7$ UFC/g, com média de $3,00.10^5$ UFC/g, foi maior do que a observada no presente estudo ($4,70.10^4 - 1,38.10^6$ UFC/g, com média de $4,32.10^5$ UFC/g), mas os valores médios concordaram entre si.

SABIONI et al (1988), estudando um surto provocado por *Staphylococcus aureus* devido ao consumo de queijo "Minas Frescal", encontraram $9,3.10^7$ UFC/g do microrganismo a partir de uma única amostra suspeita, o qual é um valor superior aos encontrados no presente estudo ($4,70.10^4 - 1,38.10^6$ UFC/g).

Comparando-se a frequência de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo "Minas Frescal", examinadas por SILVA (1980) e FURLANETTO et al (1983) observou-se, respectivamente, que 23(38,33%) das 60 amostras provenientes da cidade do Rio de Janeiro e 9(30,00%) das 30 amostras coletadas em São Paulo apresentaram contagens acima dos padrões microbiológicos regulamentares, ou seja, acima de 10^3 UFC/g. A porcentagem de amostras impróprias para consumo humano foi maior nos estudos citados acima, quando comparada aos valores obtidos no presente estudo, onde 4(22,22%) das 18 amostras examinadas apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/g.

NASCIMENTO et al (1985) analisaram 51 amostras de queijo "Minas Frescal", coletadas em Ouro Preto, e encontraram maior frequência de amostras fora dos padrões legais, do que aquela obtida no presente estudo (22,22%), já

que 46(90,20%) das amostras examinadas apresentaram contagens do *Staphylococcus aureus* maiores que 10^3 UFC/g.

CARMO & BERGDOLL (1990) estudaram um total de 18 surtos de intoxicação alimentar estafilocócico relacionados ao consumo de bolo confeitado e queijo "Minas", provenientes da região de Belo Horizonte. Seus resultados mostraram que, em 3 surtos, a contagem máxima do *Staphylococcus aureus* atingiu 10^5 UFC/g. Este valor é considerado baixo para a detecção de enterotoxina no alimento. Entretanto, estes autores consideraram que não é raro ocorrer um crescimento desigualmente distribuído no alimento, resultando em uma contagem média baixa. Além disso, em 2 destes surtos, as linhagens do *Staphylococcus aureus* isoladas produziram enterotoxina e os sintomas da doença foram típicos de envenenamento alimentar estafilocócico.

SANTOS & GENIGEORGIS (1981) analisaram 16 amostras de queijo "Minas", produzidas com leite pasteurizado inoculado com cultura láctica e 3 diferentes linhagens do *Staphylococcus aureus*. Estes autores observaram que, em 15 amostras, a produção de enterotoxina resultou do crescimento mínimo do *Staphylococcus aureus* de $1,32.10^5$ UFC/g. Em uma das amostras, a toxina foi detectada a partir de um crescimento máximo de $1,74.10^4$ UFC/g.

Considerando os resultados obtidos pelos dois estudos mencionados acima e os números do *Staphylococcus aureus*, encontrados nas amostras de queijo "Minas Frescal", analisadas no presente estudo, ou seja, $4,70.10^4$ -

1,38.10⁶ UFC/g, observa-se que tais valores estão dentro de uma faixa, na qual os referidos autores encontraram condições para a produção de níveis detectáveis de enterotoxinas ou em níveis suficientes para produzir a doença. Entretanto, nenhuma das 5 linhagens de *Staphylococcus aureus*, isoladas das amostras de queijo "Minas Frescal", produziram enterotoxinas dos tipos A, B, C₂ ou D.

Através dos resultados de contagem do *Staphylococcus aureus*, obtidos para amostras de queijo "Minas Frescal", no presente estudo, não se pode detectar se tais valores são resultado de uma população que vem aumentando ou diminuindo, ao longo do processo de produção e armazenamento deste alimento. Sendo assim, a presença do *Staphylococcus aureus*, no referido produto, representa risco potencial à saúde pública, uma vez que linhagens enterotoxigênicas podem ter crescido e produzido enterotoxina termoestável em outras fases da produção e processamento do alimento. Além disso, não se pode descartar a possibilidade da presença de linhagens produtoras da enterotoxina estafilocócica E, não testada no presente estudo.

As análises efetuadas em amostra do queijo "Minas Frescal" E, na coleta de 6/1/92, revelaram valores de 1,68.10⁵ *S. aureus*/g, concomitante com acidez de 1,23g ác. láctico/100ml. Já o mesmo produto, coletado em 9/3/92, apresentou contagens de 1,38.10⁶ *S. aureus*/g, enquanto a acidez apresentou valor de 0,68g ác. láctico/100ml.

Esses resultados mostraram uma interessante correlação com o trabalho realizado por DELAZARI et al (1978), que, estudando o desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* em queijo "Minas", em presença de culturas lácticas, observou relação inversa entre os valores de ácido láctico do produto, decorrente da atividade das culturas lácticas e a proliferação do *Staphylococcus aureus*.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os valores de pH das amostras utilizadas nas análises de *Staphylococcus aureus*, para o leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", foram, em média, 6,62, 6,64 e 5,83, respectivamente (Tabela 3).

Leite procedente de vacas normais apresenta valores de pH variando de 6,5, a 6,7. No presente estudo, apenas amostras de leite cru provenientes do produtor R apresentaram valor médio de pH=5,58, e portanto, abaixo da faixa normal, indicando poder haver presença de colostro ou formação de ácido láctico a partir da lactose pela atividade microbiana (OLIVEIRA & CARUSO, 1986).

Os valores de pH das amostras de leite pasteurizado tipo C variaram de 6,40 a 6,72, sendo semelhantes aos resultados de SANTOS et al (1981), os quais analisaram 50 amostras de leite pasteurizado provenientes da cidade de Juiz de Fora e obtiveram valores de pH entre 6,55 a 6,89.

O pH das amostras de queijo "Minas Frescal" examinadas no presente estudo variou de 5,39 a 6,25, estando

dentro da faixa de variação encontrada por WOLFSCHOON-POMBO et al (1984), os quais verificaram que, os valores de pH do referido produto variaram de 6,30 a 4,90 ao longo de 14 dias de armazenamento.

Quanto à acidez, os valores médios obtidos para as amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", foram 0,15g ác. láctico/100ml, 0,16g ác. láctico/100ml e 0,96g ác. láctico/100ml, respectivamente (Tabela 3).

De acordo com BEHMER (1984), o leite cru é ligeiramente ácido ao sair do úbere, de modo que sua acidez normal varia de 0,16-0,20g ác. láctico/100ml.

A detecção de maiores valores de acidez e menores valores de pH nas amostras de queijo "Minas Frescal", quando comparadas às de leite é esperada, já que WOLFSCHOON-POMBO et al (1984) estudaram as alterações no queijo "Minas Frescal", durante o período de armazenamento em geladeira e verificaram que a acidez do referido produto aumenta, à medida que a lactose do leite vai sendo consumida pelas bactérias ácido-láticas presentes. Quanto mais ácido láctico for produzido, menor será o pH do queijo. Sendo assim, a acidez do queijo aumenta com os dias de armazenamento, enquanto o pH diminui; o que é válido, enquanto existir lactose suficiente para ser fermentada e/ou enquanto o ácido láctico não for neutralizado na forma de lactato de cálcio.

No presente estudo, foram isoladas 201 linhagens bacterianas com características morfológicas do gênero

TABELA 3. Valores de pH e acidez titulável obtidos a partir das amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", utilizadas nas análises de ocorrência do *S. aureus* no período de dezembro de 1991 a março de 1992.

PRODUTO	AMOSTRA	pH($\bar{X}$)	ACIDEZ ($\bar{X}$) (g ác. láctico/100 ml)
QUEIJO MINAS FRESCAL	A	5,55	0,73
	B	5,39	1,94
	C	6,13	0,59
	D	6,18	0,67
	E	6,25	0,80
	F	5,49	1,02
	$\bar{X}$	5,83	0,96
LEITE PASTEURIZADO TIPO C	G	6,63	0,16
	H	6,71	0,15
	I	6,62	0,16
	J	6,66	0,15
	L	6,62	0,15
	$\bar{X}$	6,64	0,16
LEITE CRU	M	6,61	0,15
	N	6,63	0,14
	O	6,59	0,16
	P	6,65	0,14
	Q	6,64	0,14
	R	5,58	0,16
	$\bar{X}$	6,62	0,15

Staphylococcus, a partir das 56 amostras de produtos lácteos analisados, sendo que, destas, 23(11,44%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus* (Tabela 6).

As amostras de leite cru foram coletadas, a partir de 6 produtores diferentes, denominados de M, N, O, P, Q, e R. *Staphylococcus aureus* foi identificado a partir de amostras de leite cru, provenientes de todos os produtores investigados. De um total de 88 linhagens isoladas de amostras do leite cru, 18(20,45%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

Analisando-se os resultados individuais dos produtores de leite cru, observa-se que o *Staphylococcus aureus* apresentou maior frequência, a partir das linhagens isoladas das amostras provenientes do produtor P, já que 7(46,70%), das 15 linhagens suspeitas, foram identificadas como *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

Por outro lado, a menor frequência de isolamento do *Staphylococcus aureus* foi detectada em amostras de leite cru, procedentes do produtor O, verificando-se que somente 1(6,70%), das linhagens selecionadas, foi identificada como *Staphylococcus aureus*.

Foram analisadas 6 marcas de queijo "Minas Frescal", denominadas de A, B, C, D, E e F.

Os resultados mostraram que somente as marcas A e E apresentaram-se contaminadas por *Staphylococcus aureus*, sendo que a marca E apresentou a maior frequência de ocorrência do referido microrganismo neste produto lácteo, já

que, a partir de 15 linhagens isoladas, 4(26,7%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus*. Em relação à marca A, observou-se que, de 15 linhagens isoladas, somente 1 (6,70%) foi identificada como *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

Ainda que todos os testes bioquímicos realizados tenham auxiliado na diferenciação do *Staphylococcus aureus* de outras espécies bacterianas, os testes que se mostraram mais específicos na identificação do referido microrganismo foi o teste de hemólise, seguido do teste de coagulase e termonuclease. Das 186 linhagens submetidas ao teste de hemólise, 21 produziram beta-hemolisina, sendo que, destas, 20 (95,24%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus*. A partir de 201 linhagens submetidas ao teste de coagulase, 23 apresentaram nível de coagulação do plasma de 4+, de modo que 20 (86,96%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus*. A especificidade do teste de termonuclease foi de 47,92% (Tabela 5).

Os resultados do teste de hemólise, obtidos no presente estudo, foram semelhantes àqueles encontrados por BECKER et al (1989), os quais isolaram 387 linhagens do *Staphylococcus aureus* de amostras de leite cru e verificaram que 94,8% produziram beta-hemolisina. De acordo com estes autores, a produção de beta-hemolisina é considerada como a propriedade mais estável do *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

TABELA 4. Distribuição da frequência de isolamento das linhagens de *Staphylococcus aureus*, nas amostras de leite cru e de queijo "Minas Frescal", coletadas em Piracicaba, no período de dezembro de 1991 a março de 1992.

LEITE CRU	Nº LINHAGENS TESTADAS	<i>S. aureus</i>	
		Nº	%
M	15	2	13,30
N	10	2	20,00
O	15	1	6,70
P	15	7	46,70
Q	24	4	16,70
R	9	2	22,22
TOTAL	88	18	20,45

QUEIJO "MINAS FRESCAL"	Nº LINHAGENS TESTADAS	<i>S. aureus</i>	
		Nº	%
A	15	1	6,70
B	15	0	0
C	15	0	0
D	10	0	0
E	15	4	26,70
TOTAL	85	5	5,88

GARCIA et al (1980) verificaram que, de um total de 46 linhagens do *Staphylococcus aureus*, isoladas de leite cru, provenientes de vacas mastíticas, todas apresentaram atividade hemolítica.

O teste do fator "clumping" não apresentou alta especificidade na identificação do *Staphylococcus aureus*, quando comparado ao teste de coagulase, já que de um total de 96 linhagens positivas para o fator "clumping", apenas 22(22,92%) foram caracterizadas como *Staphylococcus aureus* (Tabela 5). Entretanto, a sensibilidade do teste do fator "clumping" foi de 95,65%. Tal resultado de sensibilidade, foi semelhante ao obtido por FRANCO & NIELSEN (1988), os quais encontraram valores de sensibilidade de 98,8% para o teste do fator "clumping".

De acordo com BECKER et al (1989), o fator "clumping" foi detectado somente em 171 (44,20%) linhagens do *Staphylococcus aureus*, de um total de 387 isoladas de amostras de leite cru.

Por outro lado, comparando-se os resultados do teste de coagulase com o teste do fator "clumping", para as linhagens identificadas como *Staphylococcus aureus* neste estudo (Tabela 6), verifica-se que 95,65% das culturas foram positivas para ambos os testes.

Tais resultados concordaram com os observados por GATTI et al (1988), os quais estudaram 75 amostras de *Staphylococcus* sp isoladas de bovinos e suínos, quanto à reação de coagulase em tubo e o "Staph-test". Os resultados

TABELA 5. Distribuição das linhagens bacterianas isoladas a partir dos diferentes produtos lácteos analisados, segundo a positividade para os testes realizados durante o período de novembro de 1991 a março de 1992.

TESTES	LINHAGENS TESTADAS		<i>S. aureus</i>	
	Nº	POSITIVAS	Nº POSITIVAS	% ^a
Gram (+)	175	134	23	17,16
Oxidação da glicose	201	186	23	12,36
Oxidação do manitol	201	80	23	28,75
Catalase	201	172	23	13,37
Gelatinase	201	151	23	15,23
Termonuclease ^b	201	48	23	47,92
Coagulase ^c	201	23	20	86,96
Fator "clumping"	201	96	22	22,92
Hemólise	186	21	20	95,24
Lecitinase	198	10	3	30,00

(a) - os valores de porcentagem foram calculados em relação ao número de linhagens positivas para cada teste realizado.

(b) - halo róseo $\geq 1,5$ mm

(c) - reação de coagulase 4+

da comparação entre os dois testes para amostras bovinas revelaram que, a partir de 18 linhagens testadas, 17(94,40%) apresentaram-se positivas para ambos os testes.

Os testes de fermentação da glicose e do manitol foram realizados como testes confirmativos, para as 23 linhagens presuntivamente identificadas como *Staphylococcus aureus*, sendo que 100,00% das linhagens testadas foram positivas quanto à fermentação dos carboidratos.

Considerando-se exclusivamente as linhagens identificadas como *Staphylococcus aureus* (Tabela 6), verificou-se que apenas 3(13,04%) linhagens produziram lecitinase, concordando com dados da literatura.

Segundo o ICMSF (1984), algumas linhagens do *Staphylococcus aureus* não produzem lecitinase, particularmente aquelas isoladas de produtos lácteos, ou a partir de leite cru, procedente de animais infectados com mastite clínica ou sub-clínica.

BECKER et al (1989) isolaram 387 linhagens do *Staphylococcus aureus*, a partir de leite cru e observaram que, somente 59(15,20%) produziram lecitinase, enquanto uma alta porcentagem de outras Micrococcaceae, 13(22,80%) de um total de 57 linhagens isoladas, foram lecitinase positivas.

Parece que a produção de lecitinase está mais relacionada com linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana, já que O'TOOLE (1987) estudou diferenças entre linhagens de origem humana e bovina e verificou que 38(93,00%) das 41 linhagens humanas e nenhuma das 23

linhagens de origem bovina mostraram formação de halo característico sobre o meio ágar Baird-Parker. Sendo assim, estes autores concluíram que a produção de lecitinase não deve ser utilizada para identificação do *Staphylococcus* coagulase positivo, em produtos lácteos. Comparando o resultado do estudo acima com aqueles obtidos no presente estudo (Tabela 6), poder-se-ia sugerir que, das 23 linhagens de *Staphylococcus aureus* identificadas, apenas 3 que se apresentaram lecitinase positivas seriam de origem humana, enquanto as outras 20 linhagens provavelmente seriam de origem bovina.

Analisando-se a Tabela 6, verifica-se que, dentre as 23 linhagens do *Staphylococcus aureus* identificadas a partir dos diferentes produtos lácteos examinados, as linhagens Q9, A5 e E9 apresentaram reação de coagulase 1+, 2+ e 1+, respectivamente, sendo confirmadas como *Staphylococcus aureus*, de acordo com suas outras características bioquímicas.

Estes resultados concordaram com aqueles obtidos por RAYMAN et al (1978), os quais mostraram que uma pequena porcentagem de linhagens com reação de coagulase 0 a 2+ podem ser identificadas como *Staphylococcus aureus* e devem ser submetidas a testes adicionais para confirmação da espécie.

GARCIA et al (1980) também verificaram, que de 46 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de leite cru, procedentes de leite de vacas mastíticas, somente 1 linhagem apresentou reação de coagulase 2+, mas suas outras

TABELA 6. Resultados dos testes de identificação apresentados por diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de leite cru e de queijo "Minas Frescal", durante o período de dezembro de 1991 a março de 1992.

PRODUTO	AMOSTRA	LINHAGEM	G	OG	OM	FG	FM	CAT	GL	TN	COAG	FC	HEM	LEC
LEITE CRU	M	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		M2	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
	N	N4	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	-	+
		N5	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	-	-	-
	O	O7	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
	P	P1	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		P4	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		P5	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		P7	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		P8	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	+
		P9	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		P15	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
	Q	Q1	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		Q6	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		Q9	+	+	+	+	+	+	+	+	1+	+	+	-
		Q12	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
	R	R13	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		R15	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
QUEIJO MINAS FRESCAL	A	A5	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+	-
	E	E1	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	+
		E3	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-
		E9	+	+	+	+	+	+	+	+	1+	+	-	-
		E12	+	+	+	+	+	+	+	+	4+	+	+	-

LEGENDA:

G - coloração de GRAM

OG - oxidação da glicose

OM - oxidação do manitol

FG - fermentação da glicose

FM - fermentação do manitol

CAT - prova da catalase

GL - prova da gelatinase

TN - teste de termonuclease

COAG - teste de coagulase

FC - prova do fator "clumping"

HEM - teste de hemólise

LEC - teste da lecitinase

características foram aquelas apresentadas pelo referido microrganismo.

O teste de coloração de Gram foi realizado em 175 linhagens, selecionadas do meio ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito, sendo que, destas, 134(76,57%) apresentaram-se como cocos Gram positivos na forma de cachos, catalase positivas e, portanto, presumivelmente, pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. A partir das 134 linhagens Gram positivas, 23(17,16%) foram confirmadas como *Staphylococcus aureus*.

A análise de produção de enterotoxinas, a partir das 23 linhagens do *Staphylococcus aureus* isoladas dos diferentes produtos lácteos examinados, mostraram que não houve produção de qualquer uma das enterotoxinas testadas, ou seja, dos tipos A, B, C₂ e D.

Inúmeros estudos têm demonstrado porcentagens variáveis do *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico a partir de produtos lácteos (PAYNE & WOOD, 1974; MANDIL et al, 1982; ARAÚJO, 1984; FURLANETTO et al, 1987; NADER FILHO et al ,1988c; SHINAGAWA et al, 1988; BECKER et al, 1989 e FREITAS & MAGALHÃES, 1990).

No Brasil, somente o estudo realizado por SABIONI et al (1988), enfatizou a detecção de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* em queijo "Minas Frescal", tendo sido encontradas 8 linhagens produtoras de enterotoxina, a partir de uma única amostra do produto envolvida em surto de intoxicação alimentar estafilocócica.

ARAÚJO (1984) testou 201 linhagens de *Staphylococcus aureus*, isoladas de amostras de leite cru procedentes de Pirassununga e verificou que apenas 1(0,50%) delas foi capaz de produzir enterotoxina, enquanto que SCHOCKEN-ITURRINO et al (1986) analisaram 19 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru provenientes de vacas mastíticas e encontraram 3(15,79%) linhagens enterotoxigênicas.

Existem linhagens de *Staphylococcus aureus* altamente produtoras e pouco produtoras de enterotoxina, o que poderá influenciar na detecção da toxina no alimento ou a partir das linhagens isoladas dos alimentos.

KOKAN & BERGDOLL (1987) analisaram a produção de enterotoxina por 110 linhagens de *Staphylococcus aureus* utilizando o ELISA. As linhagens testadas haviam sido previamente identificadas como produtoras de enterotoxinas, através do teste de reação emética em macacos, mas negativas quanto à produção de enterotoxinas, pelo método de placa de sensibilidade ótima. Do total de linhagens testadas, 26 (23,60%) foram positivas quanto à produção de enterotoxinas; destas, 23 produziram apenas a enterotoxina D ou em combinação com a enterotoxina A ou C, 1 linhagem produziu somente a enterotoxina A e 2 somente a enterotoxina C.

Estes autores observaram, que linhagens de *Staphylococcus aureus*, produtoras de enterotoxina D, têm causado inúmeros surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, principalmente a partir de produtos lácteos.

A maior parte das linhagens enterotoxina D positivas produzem cerca de 1/5 da quantidade de enterotoxina detectada pelas linhagens enterotoxina A positivas (ROBBINS et al, 1974), o que poderia, em parte, explicar a dificuldade para detecção de linhagens que produzem pequenas quantidades de enterotoxina D, pelo método de placa de sensibilidade ótima. As linhagens produtoras de pequenas quantidades de enterotoxina D são importantes, já que somente 100 - 200 ng são necessários para causar a doença, principalmente em velhos e crianças.

O estudo realizado por PEREIRA et al (1991), enfatizou a detecção da produção de enterotoxina D pelo método ELISA, utilizando 4 linhagens de *Staphylococcus aureus* produtoras de baixas quantidades da referida enterotoxina. Os resultados mostraram que linhagens estafilocócicas produtoras de enterotoxina, a nível de ng/ml em meio de laboratório, não detectável pelos métodos de difusão em gel, podem produzir enterotoxina suficiente (ng/g) no alimento para causar intoxicação alimentar. Porém, a utilização dessa metodologia é onerosa, e em geral não disponível em países em desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e a discussão desenvolvida no presente estudo permitiram algumas conclusões, relacionadas à qualidade microbiológica dos produtos lácteos analisados.

(a) - Todas as amostras de queijo "Minas Frescal" contaminadas por *Staphylococcus aureus*, detectadas no presente estudo, apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos legais, indicando que as mesmas são impróprias para o consumo humano e, portanto, deve ser executado um maior controle por parte do poder público, para se evitar a comercialização e o consumo de tais produtos.

(b) - Embora não se tenha detectado nenhuma linhagem de *Staphylococcus aureus* produtora de enterotoxinas dos tipos A, B, C₂ ou D, pela metodologia empregada, amostras de queijo "Minas Frescal" e leite cru apresentaram níveis populacionais que podem permitir produção de enterotoxinas estafilocócicas nos referidos produtos, representado risco potencial à saúde pública.

(c) - As amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas não apresentaram contaminação por *Staphylococcus aureus* e, sendo assim, estão dentro dos padrões legais.

(d) - Tanto amostras de queijo "Minas Frescal" quanto de leite cru apresentaram contagens que podem permitir produção de enterotoxinas estafilocócicas no alimento, representando risco potencial à saúde pública.

(e) - Dentre os produtos lácteos analisados, o leite cru apresentou o maior número de amostras contaminadas por *Staphylococcus aureus*, indicando que há necessidade de maiores cuidados higiênicos durante a ordenha, bem como maior controle sanitário do rebanho bovino na região de Piracicaba, tendo em vista que a qualidade final dos produtos lácteos depende, grandemente, da qualidade inicial da matéria-prima.

(f) - Sugere-se que, em estudos futuros, seja efetuada a análise da presença das enterotoxinas estafilocócicas nos produtos lácteos, associada à verificação da ocorrência do *Staphylococcus aureus*. Isto devido à natureza termoestável das enterotoxinas estafilocócicas e à sua capacidade de resistir aos processos de manufatura de queijos e pasteurização, representando, portanto, risco potencial à saúde pública, se, em alguma etapa do processamento, o *Staphylococcus aureus* permanecer viável e produzir enterotoxina suficiente para causar a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAR, F.M. & MOHAMMED, M.T. Identification of some enterotoxigenic strains of staphylococci from locally processed cheese. Food Microbiology, London, 3(1): 33-6, Jan. 1986.

ABO-ELNAGA, I.G.; HESSAIN, A.; SARHAN, H.R. Bacteria and food poisoning organisms in milk. Die Nahrung Food, Berlin, 29(4): 375-80, 1985.

ANDREWS, G.P. & MARTIN, S.E. Heat inactivation of catalase from *Staphylococcus aureus* MF-31. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 37(6): 1180-5, June 1979a.

ANDREWS, G.P. & MARTIN, S.E. Catalase during the recovery of heat-stressed *Staphylococcus aureus* MF-31. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 38(3): 390-4, Sept. 1979b.

ARAÚJO, W.P. de. *Staphylococcus aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina e caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, 1984. 127p. (Doutoramento - Faculdade de Saúde Pública/USP).

ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.J.; AZAVEDO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 69(supplement): 101S-17S, 1990.

ARMIJO, R.; HENDERSON, D.A.; TIMOTHÉE, R.; ROBINSON, H.B. Food poisoning outbreaks associated with spray-dried milk - an epidemiologic study. American Journal Public Health, Washington, 47: 1093-100, Sept. 1957.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15 ed. Arlington, 1990. v.1 e 2. cap.17, 32. p. 449-55; p. 802-5.

BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. The Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 69(supplement):1S-8S, 1990.

BAKHEIT, M.R.; AHMED, H.J.; EL-AMIN, E.P.M. Isolation of *Staphylococcus aureus* from food poisoning of cheese. Bulletin of Animal Health and Production in Africa, Khartoum, 39(4): 459, 1991. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 55(1): 58, Jan. 1993. (Resumo).

BATISH, V.K.; NATARAJ, B.; GROVER, S. Variation in the behaviour of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* after heat stress in milk. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 66(1): 27-35, Jan. 1989.

BATISH, V.K.; NATARAJ, B.; GROVER, S. Variations in growth of *Staphylococcus aureus* 234 after heat stress in milk. Lait, Paris, 70: 453-7, 1990. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 53(5): 406, May 1991. (Resumo).

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOUDING, J.S.; IVEY, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5 year summary, 1983-1987. Journal of Food Protection, Ames, 53(8): 711-28, Aug. 1990.

BECKER, H.; GANG-STILLER, K.; TERPLAN, G. Characterization of *Staphylococcus aureus* strain isolated from raw milk with special reference to the clumping factor. Netherlands Milk Dairy Journal, Wa Geningen, 43(3): 355-66, 1989.

BEHMER. M.L.A. **Tecnologia do leite**. São Paulo, Nobel. 1984.
cap. 13. p.106.

BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus*. In: FOOD AND DRUG
ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 6. ed.
Arlington, AOAC, 1984. cap. 14, 15. p. 14.01-14.05; p.
15.01-15.11.

BENNETT, R.W; YETERIAN, M.; SMITH, W.; COLES, C.M.; SASSAMAN,
M.; Mc CLURE, F.D. *Staphylococcus aureus* identification
characteristics and enterotoxigenicity. Journal of Food
Science, Chicago, 51(5): 1337-9, Sept./Oct. 1986.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*.
International Journal of Food Microbiology, Amsterdam,
10(2): 91-100, Mar. 1990.

BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; AVENA, R.M. Identification of a
new enterotoxin as enterotoxin C. Journal Bacteriology,
Washington, 90(5): 1481-5, Nov. 1965.

BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K.F.
Identification of enterotoxin E. Infection and Immunology,
Washington, 4: 593-5, 1971.

BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. **Clínica veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 1983. cap. 15. p. 352-93.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº1, de 28 de janeiro de 1987. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo, 1990. v. 1/A.

BRYAN, F.L. Epidemiology of milk-borne diseases. Journal of Food Protection, Ames, 46(7): 637-49, July 1983.

BRYANT, R.G.; JARVIS, J.; GUIBERT, G. Selective enterotoxin production by a *Staphylococcus aureus* strain implicated in a foodborne outbreak. Journal of Food Protection, Ames, 51(2): 130-1, Feb. 1988.

BUSANI, S.F.B. & OLIVEIRA, J.S. Leite pasteurizado: sua qualidade desde a fonte de produção. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 19(2): 113-20, jul./dez. 1989.

CARMO, L.S. DO & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). Revista de Microbiologia, São Paulo, 21(4): 320-3, out./dez. 1990.

CARUSO, J.G.B. & OLIVEIRA, A.J. de. **Leite: obtenção, controle de qualidade e processamento.** São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 116p.

CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. Journal Bacteriology, Washington, 85: 715-6, 1963.

CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W.; DORSEY, A.E.; ISSA, J.A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. Journal Bacteriology, Washington, 94(6): 1875-82, Dec. 1967.

CASTRO, R. Estudio comparativo de las pruebas bioquímicas empleadas para la determinación de *Staphylococcus aureus* em alimentos. Revista de Microbiologia, São Paulo, 15(4): 253-7, out./dez. 1984.

CERQUEIRA-CAMPOS, M.L.; IARIA, S.T.; FURLANETO, S.M.P.; PERRONE, S.M. Grupos de microrganismos em amostras de leite pasteurizado, vendido na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12. São Paulo, 1983. Programa e Resumos. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 146.

- CHIRIFE, J.; VAAMONDE, G.; SCARMATO, G. On the minimal water activity for growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science, Chicago, 47(6): 2054-57, Nov./Dec. 1982.
- COSTA, A.L. & LEVY, C.E. Caracterização do *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis*: estudo comparativo entre os testes convencionais e o teste da termonuclease. Revista de Microbiologia, São Paulo, 20(2): 157-64, abr./jun. 1989.
- DANGLA, I.G.; SOLÍS, R.M.; BARQUERO, C.; NÚÑEZ, B. Calidad microbiologica de los quesos producidos a nivel artesanal en Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Guatemala, 35(3): 466-79, Sept. 1985.
- DELAZARI, T.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; EIROA, M.N.U.; VALLE, J.L.E. Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina em queijo tipo Minas. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9: 163-74, 1978.
- EL-DAIROUTY, K.R. Staphylococcal intoxication traced to non-fat dried milk. Journal of Food Protection, Ames, 52(12): 901-2, Dec. 1989.

- ERIKSON, A. & DEIBEL, K.H. Production and heat stability of staphylococcal nuclease. Applied Microbiology, Baltimore, 25(3): 332-6, Mar. 1973.
- ESCARTÍN, E.F.; AYALA, A.C.; VITELA, R.T. Incidência de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados. Revista Latinoamericana de Microbiologia, México, 24(2): 83-8, Abr./Jun. 1982.
- EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal food poisoning. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 7(4): 311-6, Dec. 1988.
- EWALD, S. & NOTERMANS, S. Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 6(1): 25-30, Feb. 1988.
- FLOWERS, R.S.; MARTIN, S.E.; BREWER, D.G.; ORDAL, Z.J. Catalase and enumeration of stressed *Staphylococcus aureus* cells. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 33(5): 1112-7, May 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 *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos. Revista de Microbiologia, São Paulo, 19(1): 27-8, jan./mar. 1988.

FREITAS, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. Revista de Microbiologia, São Paulo, 21(4): 315-9, out./dec. 1990.

FROEDER, E.; PINHEIRO, A.J.R.; BRANDÃO, S.C.C. Variação da qualidade microbiológica do leite cru tipo "C" da região de Viçosa. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 40(241):55-68, set./out. 1985.

FURLANETTO, S.M.P.; CERQUEIRA-CAMPOS, M.L.; IARIA, S.T. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* em queijo Frescal, vendido em supermercado no Município de São Paulo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12. São Paulo, 1983. Programa e Resumos. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 144.

FURLANETTO, S.M.P.; NADER-FILHO, A.; WILSON, D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Staphylococcus aureus* isolados a partir de leite de vacas mastíticas. Revista de Microbiologia, São Paulo, 18(2): 138-43, abr./jun. 1987.

GALLO, C.R. Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade. Piracicaba, 1978. 93p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GARCIA, M.L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 39(3): 548-53, Mar. 1980.

GATTI, M.S.V.; CASTRO, A.F.P.; HARA, N.H. Comparação do Staph-test e o teste de coagulase em tubo, na identificação de amostras patogênicas de estafilococos de origem animal. Revista de Microbiologia, São Paulo, 19(3): 235-40, jul./set. 1988.

GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 9(4): 327-60, Dec. 1989.

GILMOUR, A. & HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 69(supplement): 147S-66S, 1990.

GÓMEZ-LUCIA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; DOMENECH, A.; HERNANDEZ, F.J.; QUITERIA, J.A.R-S.; LOPEZ, B.; BLANCO, J.L.; SUÁREZ, G. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego - type cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, 75(1):19-25, Jan. 1992.

GRAVANI, R.B. Food Science Facts. Dairy and Food Sanitation, Ames, 4(5): 187-8, May, 1984.

HALPIN-DOHNALEK, M.I. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. Journal of Food Protection, Ames, 52(4): 267-82, Apr. 1989a.

HALPIN-DOHNALEK, M.I. & MARTH, E.H. Growth of *Staphylococcus aureus* in milks and creams with various amounts of milk fat. Journal of Food Protection, Ames, 52(8): 540-3, Aug. 1989b.

HENDRICKS, S.L.; BELKNAP, R.A.; HAUSLER Jr., W.J. Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese. I. Epidemiology. Journal Milk of Food Technology, Ames, 22(10): 313-7, Oct. 1959.

HORNER, K.J. & ANAGNOSTOPOULOS, G.D. Effect of water activity on heat survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella seftenberg*. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 38(1): 9-17, Feb. 1975.

HUGHES, A. & HURST, A. The effect of NaCl on the upper temperature limit for growth and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26(4): 507-10, Apr. 1980.

HURST, A.; OFORI, E.; EL-BANNA, A.A.; HARWIG, J. Adaptational changes in *Staphylococcus aureus* MF31 grown above its maximum temperature when protected by NaCl: physiological studies. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 30(9): 1105-11, Sept. 1984.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Bacteria associated with foodborne diseases. Food Technology, Chicago, 42(4): 181-200, Apr. 1988.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**, Zaragoza, Acribia, 1984. p.221-260.

ISIGIDI, B.K.; MATHIEU, A.-M.; DEVRIESE, L.A.; GODARK, C.;
VAN HOOFF, J. Enterotoxin production in different
Staphylococcus aureus biotypes isolated from food and meat
plants. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 72(1):
16-20, Jan. 1992.

KAYIHURA, M.; KABURIA, H.F.A.; ARIMI, S.M.; LINDQUIST, K.J.
Staphylococcal enterotoxin "A" in raw and pasteurized
milk. East African Medical Journal, Nairobi, 64(3): 177-
82, 1987. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford,
52(10): 818, Oct. 1990. (Resumo).

KLOOS, W.E. Sistematic and the natural history of
staphylococci. Journal of Applied Bacteriology, Oxford,
69(supplement): 25S-37S, 1990.

KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Genus II. *Staphylococcus*. In:
SNEAH, P.H.A., ed. **Bergey's manual of sistematic
bacteriology**. 9. ed., Baltimore, Willians & Wilkins, 1986.
v.2. cap.12. p. 1013-135.

KOHLI, J.K.; PATIL, M.S.; PANDEY, V.N.; PRADHAN, D.S.
Extracellular nucleases in *Staphylococcus aureus*. Journal
of General and Applied Microbiology, Tokyo, 35(6): 429-39,
Dec. 1989.

KOKAN, N.P. & BERGDOLL, M.S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 53(11): 2675-76, Nov. 1987.

KOUJIMA, I.; HAYASHI, H.; TOMOCHIKA, K.; OKABE, A.; KANEMASA, Y. Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 35(3): 467-70, Mar. 1978.

LACHICA, R.V.F. Egg yolk-free Baird-Parker medium for the accelerated enumeration of foodborne *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 48(4): 870-1, Oct. 1984.

LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Methacromatic ágar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Applied Microbiology, Baltimore, 21(4): 585-7, Apr. 1971.

LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D.; RIEMANN, H.P. Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. Applied Microbiology, Baltimore, 23(5): 994-7, May 1972.

LACHICA, R.V.F.; WEISS, K.F.; DEIBEL, R.H. Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, Baltimore, 18(1): 126-7, July 1969.

LEITÃO, M.F. de F. Métodos para a caracterização de *Staphylococcus aureus* enteropatogênico. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 12(36): 21-47, dez. 1973.

LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.S.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxins A, D, and E by sac culture. Journal of Food Protection, Ames, 54(8): 650-2, Aug. 1991.

LOPES, H.R.; NOLETO, A.L.S.; LAS HERAS, M.D. de.; BERGDOLL, M.S. Selective enterotoxins production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produced more than one enterotoxin. Journal of Food Protection, Ames, 56(6): 538-40, June 1993.

LOTTER, L.P. & LEISTNER, L. Minimal water activity for enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 36(2): 377-80, Aug. 1978.

- MANDIL, A.; MORAIS, V.A.D.; PEREIRA, M.L.; FAGUNDES, J.M.S.; CARMO, L.S.; CORREIA, M.G.; CASTRO, E.P.; GOMEZ, M.J.V.M. *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "Minas". Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2(2): 233-41, jul./dez. 1982.
- MARSHALL, V.M. Inoculated ecosystems in a milk environment. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 73(supplement): 127S-35S, 1992.
- MATOS, J.S.; WHITE, D.G.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. Journal of Dairy Science, Champaign, 74(5): 1544-9, May, 1991.
- MESQUITA, A.J.; SERAPHIN, J.C.; RIBEIRO, J.L.; DIAS FILHO, F.C. Enumeração de *Staphylococcus* em leite cru. Anais da Escola de Agronomia e Veterinária, Goiânia, 18(1): 5-11, jan./dez. 1988.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. I. The staphylococci: characteristics, isolation and behavior in artificial media. Journal of Milk Food Technology, Ames, 34(11): 557-64, Nov. 1971.

MORTON, H.E. & COHN, J. Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. Applied Microbiology, Baltimore, 23(4): 725-33, Apr. 1972.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 43(259): 13-7, set./out. 1988a.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; SCHOCHEN-ITURRINO, R.P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em amostras de leite tipo B "in natura". Ciência Veterinária Jaboticabal, Jaboticabal, 2(2): 19-20, jul. 1988b.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite sub-clínica. Revista de Microbiologia, São Paulo, 19(4): 369-73, out./dez. 1988c.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. Revista de Microbiologia, São Paulo, 20(3): 261-6, jul./set. 1989.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JÚNIOR, O.D.
Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo B, comercializado em Jaboticabal. Arquivos de Veterinária, Jaboticabal, 4(1): 99-104, jan. 1988.

NASCIMENTO, G.G.F.; FIGUEIREDO, S.H.M.; UBISSES, D.M.;
ANTONELLI, E.M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, S.P. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 25(1): 13-21, jan./jun. 1991.

NASCIMENTO, R. do; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R.
Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 19(2): 120-9, abr./jun. 1985.

NISKANEN, A. & AALTO, M. Comparison of selective media for coagulase positive enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 35(6): 1233-6, June 1978.

NOLETO, A.L. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. Applied Microbiology, Washington, 39(6): 1167-71, June 1980.

NOUR, M.A.; EL-HINDAWY, M.; NOEMAN, Z. Staphylococci in Arab cheese I. Incidence and enterotoxigenicity. Egyptian Journal of Dairy Science, Cairo, 14(1): 11-8, 1986. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 48(12): 832, Dec. 1986. (Resumo).

NOUR, M.A.; NAGUIB, M.M.; TOHAMY, M.M. Contamination level and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* from market Domiati cheese. Egyptian Journal of Dairy Science, Cairo, 19(1): 93-8, 1991. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 53(12), 1011, Dec. 1991. (Resumo).

OLIVEIRA, A.J. de. & CARUSO, J.G.B. Leite: características, composição química, propriedades, obtenção higiênica, conservação e tratamento. In: CAMARGO, R. de. et al. **Tecnologia dos produtos agropecuários - alimentos**. São Paulo, Nobel, 1986. cap. 12. 191-203.

OLIVEIRA, J.S. & BORGES, S.F. Qualidade do leite pasteurizado. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 39(235): 29-33, set./out. 1984.

OTERO, A.; GARCÍA, M.C.; GARCÍA, M.L.; PRIETO, M.; MORENO, B. Behavior of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C₁ or C₂, during the manufacture and storage of Burgos cheese. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 64(2): 117-22, Feb. 1988.

- O'TOOLE, D.K. Differences in egg yolk reaction on Baird-Parker medium between bovine and human strains of coagulase-positive staphylococci. Letters and Applied Microbiology, Oxford, 4(5): 111-2, May 1987.
- PARK, C.E.; SERRANO, A. de M.; LANDGRAF, M.; HUANG, J.C.; STANKIEWICZ, Z.; RAYMAN, M.K. A survey of microorganisms for thermonuclease production. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26(4): 532-5, Apr. 1980.
- PAYNE, D.N. & WOOD, J.M. The incidence of enterotoxin production in strain of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 37(3): 319-25, Sept. 1974.
- PEREIRA, J.L.; SALZBERG, S.P.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 14(1): 19-26, Oct. 1991.
- RAIMUNDO, S.M. do C. & ROBBS, P.G. Detection of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp. in some milk products sold in Rio de Janeiro City. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 11(1-2): 69-76, jan. 1988. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 52(12): 993, Dec. 1990. (Resumo).

RAYMAN, M.K.; DEVOYOD, J.J.; PURVIS, U.; KUSCH, D.; LANIER, J.; GILBERT, R.J.; TILL, D.G.; JARVIS, G.A. ICMSF methods studies. X. An international comparative study of four media for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 24(3): 274-81, Mar. 1978.

RAYMAN, K.; MALIK, N.; JARVIS, G. Performance of four selective media for enumeration *Staphylococcus aureus* in corned beef and cheese. Journal of Food Protection, Ames, 51(2): 87-8, Feb. 1988.

REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A.L.; KHOE, G.P.; BERGDOLL, M.S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. Infection and Immunology, Washington, 45: 625-30, 1984.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2 ed. São Paulo, Atheneu, 1992. 320 p.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Applied Microbiology, Baltimore, 28(6): 940-50, Dec. 1974.

- ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. Estudo comparativo entre os testes de coagulase e termonuclease na identificação do *Staphylococcus aureus*. Revista de Microbiologia, São Paulo, 16(4): 269-71, out./dez. 1985.
- SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo "Minas" contaminado com *Staphylococcus aureus*. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 22(5): 458-61, out. 1988.
- SANTOS, E.C. dos & GENIGEORGIS, C. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured brasilian Minas cheese. Journal of Food Protection, Ames, 44(3): 177-84, Mar. 1981.
- SANTOS, E.C. dos; GENIGEORGIS, C.; FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of brasilian Minas cheese. Journal Food Protection, Ames, 44(3): 172-6, Mar. 1981.
- SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 11(1): 1-20, Aug. 1990.

- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; FURLANETTO, S.M.P.; NADER-FILHO, A.; ROSSI-JÚNIOR, O.D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em amostras de leite de vacas mastíticas. Arquivos de Veterinária, Jaboticabal, 2(1): 69-74, 1986.
- SHINAGAWA, K.; TANABAYASHI, K.; KOGURE, Y.; MATUSAKA, N.; KONUMA, H. Incidence and population of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk from milking to milk plant. Japanese Journal of Veterinary Science, Tokyo, 50(5): 1060-4, 1988.
- SILVA, C.A.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal, consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4. Rio de Janeiro, 1980. Programa e Resumos. São Paulo, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p. 202.
- SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARUWATARI, J.H.; CHICOUREL, E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 43(260): 40-5, nov./dez. 1988.

- SMIEBERT, R.M. & KRIEG, N.R. General characterization. In: GERHARDT, P. ed. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington, American Society for Microbiology. 1981. Cap.20. p.409-449.
- SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. Journal of Food Protection, Ames, 46 (6): 545-55, June 1983.
- SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, Washington, 29(4): 502-5, Apr. 1975.
- SU, Y-C. & WONG, A.C.L. Optimal condition for the production of unidentified staphylococcal enterotoxins. Journal of Food Protection, Ames, 56(4): 313-6, Apr. 1993.
- SUDHAKAR, P.; RAO, R.N.; BHAT, R.V.; GUPTA, C.P. The economic impact of a foodborne disease outbreak due to *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection, Ames, 51(11): 898-900, Nov. 1988.
- TATINI, S.R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. Journal of Milk and Food Technology, Ames, 36(11): 559-63, Nov. 1973.

- TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; OLSON JUNIOR, J.C.; CASMAN. E.P. Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. Journal of Dairy Science, Champaign, 54(3): 312-20, Mar. 1971.
- TAWFEK, N.F.; SHARAF, O.M.; HEWEDY, M.M. Incidence of pathogens and staphylococcal enterotoxins in Kareish cheese. Egyptian Journal of Dairy Science, Cairo, 16(2): 295-300, 1988. Apud Dairy Science Abstracts, Wallingford, 51(7): 306, July 1989. (Resumo).
- TIBANA, A.; RAYMAN, K.; AKHTAR, M.; SZABO, R. Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in a buffered system. Journal of Food Protection, Ames, 50(3): 239-42, Mar. 1987.
- TODD, E.C.D. Foodborne disease in Canada - a 5 year summary. Journal of Food Protection, Ames, 46(7): 650-7, July 1983a.
- TODD, E.C.D. Factors that contributed to foodborne disease in Canada, 1973-1977. Journal of Food Protection, Ames, 46(8): 737-47, Aug. 1983b.
- TROLLER, J.A. Effect of water activity on enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, Baltimore, 24(3): 440-3, Sept. 1972.

TROLLER, J.A. Effect of water activity on enterotoxin B production and growth of *Staphylococcus aureus*. Applied Microbiology, Baltimore, 21(3): 435-9, Mar. 1971.

TROLLER, J.A. & STINSON, J.V. Influence of water activity on the production of extracellular enzymes by *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 35(3): 521-6, Mar. 1978.

UBOLDI-EIROA, M.N. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causados por alimentos processados. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 19(2): 101-12, jul./dez. 1989.

UMOH, V.J.; OBAWEDE, K.S.; UMOH, J.U. Contamination of infant powdered milk in use with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology, London, 2(4): 255-61, Oct. 1985.

VAN NETTEN, P.; VAN DER VEN, J.; JAISLI, F.; MOSSEL, D.A.A. The enumeration of sublethally injured populations of *Staphylococcus aureus* in foods. Letters in Applied Microbiology, Oxford, 10(3): 117-22, Mar. 1990.

VASAVADA, P.C. Pathogenic bacteria in milk - a review. Journal of Dairy Science, Champaign, 71(10): 2809-16, Oct. 1988.

VESSONI-PENNA, T.C.; BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J. Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 6(1): 57-74, jan./jun. 1986.

WENDAP, L.L. & ROSA, O.O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas consumido no município de Cuiabá - M.T. Higiene Alimentar, São Paulo, 7(27): 23-9, ago. 1993.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; CASAGRANDE, H.R.; LOURENÇO NETO, J.P.M.; MUNCK, A.V. Alterações no queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 39(233): 3-9, maio/junho 1984.

ZOTTOLA, E.A. & SMITH, L.B. Pathogens in cheese. Food Microbiology, London, 8(3):171-82, Sept. 1991.