WANDERLEY PEREIRA DE ARAUJO

***Staphylococcus aureus* EM LEITE CRU.
PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA E CARACTERIZAÇÃO
DA ORIGEM PROVÁVEL, HUMANA OU BOVINA, A
PARTIR DAS CEPAS ISOLADAS**

Tese apresentada ao
Departamento de Prática de Saúde Pública
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutor.

Orientador:
Prof. Dr. Gil Vianna Palm

São Paulo
1984

À memória de meu avô
Manoel Pereira de Araújo

À Christina
e a meus filhos
André e Marcos.

AGRADECIMENTOS

Na apresentação deste trabalho, é com imensa satisfação que a seguir externamos, publicamente, nossos agradecimentos a todos os que colaboraram na sua realização:

Ao Prof. Dr. Gil Vianna Paim, pela orientação e amizade proporcionados desde o início de nossa formação na Faculdade de Saúde Pública da USP.

Ao Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria, a quem devo imensa gratidão, pela orientação, confiança, amizade e apoio dispendidos em todas as fases da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Solé-Vernin pelos ensinamentos transmitidos, pela orientação segura e auxílio prestados na realização das provas de fagotipagem.

Ao Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll, pelo fornecimento das enterotoxinas e antienterotoxinas padrões e, também, pelas sugestões apresentadas por ocasião de sua estada em São Paulo, em 1982.

Aos Profs. Drs. Maureen de Saxe e P.G. Francis pelo fornecimento dos bacteriófagos do Conjunto Básico Internacional Bovino utilizados neste experimento.

Aos Profs. Drs. Eduardo Harry Birgel e Leonardo Miranda de Araújo, pelo apoio e valiosas sugestões apresentadas na re-

visão da redação original.

Aos Profs. Drs. José Cézar Panetta, Maria Lúcia Corqueira-Campos, Sílvio Arruda Vasconcellos e Hassib Ashcar pelas valiosas sugestões e críticas apresentadas na revisão da redação original.

Ao Prof. Dr. Omar Miguel, pelas sugestões oferecidas no planejamento e na apresentação dos resultados deste trabalho.

À Laborterápica Bristol Química e Farmacêutica Ltda., através de seu Departamento de Metabolismo de Drogas e Farmacocinética, pelo fornecimento de meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas e de pesquisa de enterotoxina, pela cessão de seus laboratórios na fase de isolamento e identiificação das cepas e pela valiosa colaboração prestada por seus funcionários.

Aos técnicos de laboratório Rosa Alexandrino de Oliveira, Adilson Manoel Godoy, Maria Alice de Oliveira da Silva e José Moraes de Godoy, pelo auxílio prestado na pesquisa de produção de enterotoxina e prova de termonuclease.

À técnica de laboratório Olga Coelho de Castro pela colaboração prestada durante a realização das provas de fagotipagem.

Ao técnico de laboratório José Henriques, pela amizade e auxílio prestados durante a realização das provas bioquímicas adicionais.

Aos Profs. Drs. Arlindo Garcia Moreno e Vicente Borelli, pelas facilidades e colaboração prestadas na obtenção das amostras de leite.

À Profª Drª Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães, pelo incentivo e colaboração prestados durante a fase inicial deste experimento.

Ao Prof. Dr. Donald Wilson pelo auxílio prestado na versão para o inglês do resumo.

Às bibliotecárias Ana Maria Silveira Barone e Daisy Pires Noronha e às auxiliares Maria Inês Chiarelli de Camargo e Maria de Fátima Miranda, pela colaboração dada na revisão e ordenação das referências bibliográficas e durante a fase de pesquisa bibliográfica.

Às Sras. Vera Lúcia Henriques Mastroleo, Maria Christina Lima de Araújo e Rosalina Soares do Nascimento, pelos serviços datilográficos.

À Dna. Norma Timóteia e a seus filhos, pelo carinho e amizade oferecidos.

Nossa sincera gratidão a todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização desta Tese.

"O valor da vida não está na duração dos dias mas no uso que fazemos deles; um homem pode viver muito e não viver. Encontrar satisfação na vida não depende do número de anos que se tem, mas da vontade."

Montaigne, Ensaios
1533-1592

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Obtenção das amostras de leite	25
2. Diluição das amostras	27
3. Semeadura inicial das amostras de leite, contagem, isolamento de colônias suspeitas e identificação de <i>S. aureus</i>	27
3.1 Prova da catalase	28
3.2 Prova da oxidação-fermentação (O/F) da glicose se	28
3.3 Prova da coagulase em tubo - coagulase livre ...	29
3.4 Prova da termonuclease	29
4. Comportamento das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas, frente a provas bioquímicas adicionais	30
4.1 Prova da utilização do manitol em aerobiose e anaerobiose	30
4.2 Prova da utilização da maltose em aerobiose .	31
4.3 Prova da produção de acetoína	31
4.4 Prova da pigmentação das colônias	31
4.5 Prova do cristal violeta	32
4.6 Prova da fibrinolisisina	32
4.7 Provas da coagulase em plasmas bovino e huma no	33
5. Fagotipagem das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas	33
6. Critérios para a determinação da origem provável humana ou bovina das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas .	36
6.1 Frente às provas de coagulase e fibrinolisi- na	36
6.2 Frente à fagotipagem	38

6.3	Considerando-se as provas de coagulase, fibrinolise e de fagotipagem	41
7.	Verificação da produção de enterotoxina a partir das cepas de Staphylococcus aureus isoladas	43
7.1	Enterotoxinas e anti-enterotoxinas estafilocócicas padrões	43
7.2	Produção de enterotoxina pelas cepas de Staphylococcus aureus	44
7.3	Pesquisa de enterotoxina estafilocócica	45
	RESULTADOS	49
	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO 1	- Técnicas de preparo das soluções e dos meios de cultura, empregados no presente trabalho	120

RESUMO

Foram analisadas 100 amostras de leite cru obtidas na plataforma de recepção da Usina de Pasteurização localizada no Município de Pirassununga, São Paulo.

A partir de cada amostra foi realizada a contagem de **Staphylococcus aureus** em ágar Baird-Parker, e as cepas isoladas foram identificadas através das provas de catalase, fermentação e oxidação da glicose, coagulase em plasma de coelho e da termonuclease.

Além destas, foram realizadas as provas adicionais de produção de acetoina, pigmento em ágar simples e em ágar cristal violeta, fibrinolisisina, coagulase em plasmas humano e bovino, da utilização do manitol e maltose e, também, de fagotipagem, para se tentar caracterizar a origem provável, humana ou bovina, das cepas isoladas. Cada cepa foi submetida a provas de verificação da capacidade produtora de enterotoxina.

Das 100 amostras analisadas, 50 (50%) revelaram-se positivas para **S. aureus** cujas contagens variaram de 30 a 110.000/ml de leite.

Das 201 cepas de **S. aureus** isoladas, a grande maioria formou colônias de cor amarela em ágar simples (98,5%), produziu acetoina (87,1%) e utilizou a maltose (97,5%) e o manitol (94%), enquanto 70,6% formou colônias amarelas e 27,9% violetas em ágar cristal violeta, comportando-se, assim, como cepas de origem provável humana ou bovina.

Em relação às provas de fibrinolisina e de coagulase em plasmas humano e bovino, 31,8% e 13,9% das cepas foram consideradas como sendo de origem humana e bovina, respectivamente. As demais foram tidas como intermediárias com tendência ou não de serem de origem humana ou bovina.

Quanto à fagotipagem, 17,4% e 11,4% das 201 cepas isoladas, revelaram-se não tipáveis frente aos fagos dos Conjuntos Básicos Internacionais Humano e Bovino, respectivamente. Entre as tipáveis, predominaram as cepas sensíveis a fagos do grupo III (33,8%) e III/NC (15,9%) do Conjunto Básico Humano e a fagos dos grupos III (16,9%), IV (17,4%) e III/IV (12,4%) do Conjunto Básico Bovino. Houve uma grande variabilidade quanto aos fagótipos de *S. aureus* obtidos, muitos dos quais foram lisáveis a um número alto de fagos, de ambos os conjuntos.

Associando-se os resultados das provas de fibrinolisina, coagulase em plasmas humano e bovino e da fagotipagem, de acordo com os critérios estabelecidos, 19,9% das cepas foram consideradas como sendo de origem provável humana, 10,4% bovina e 17,9% e 27,9% intermediárias, com tendência a serem de origem provável humana e bovina, respectivamente; para 23,9% das cepas não houve possibilidade de caracterizar-se a origem provável e foram consideradas intermediárias sem tendência a serem de origem humana ou bovina.

De apenas uma amostra de leite, cuja contagem de *S. aureus* foi de 860/ml, isolou-se uma cepa enterotoxigênica, produtora de enterotoxina do tipo B, a qual se revelou com características de cepa de origem, provavelmente, humana.

Pelos resultados obtidos, depreende-se que tanto bovinos quanto o homem, tiveram participação importante na contaminação por **S. aureus** constatada nas amostras de leite analisadas.

SUMMARY

One-hundred samples of raw milk, collected at the reception platform of the pasteurization plant located in Pirassununga, São Paulo, Brazil, were examined for **Staphylococcus aureus**.

Counts on Baird-Parker agar were performed on each sample and the strains isolated were tested for catalase, fermentation and oxidation of glucose, coagulase in rabbit plasma and thermonuclease.

Additional tests were performed: acetoin, pigment formation on simple agar and crystal violet agar, fibrinolysin, coagulase in human and bovine plasma, manitol and maltose utilization, as well as phage-typing in an attempt to identify probable origin, whether human or bovine. Each one of the strains were examined for enterotoxin production capacity.

Of the one-hundred samples studied, 50 were positive for **S. aureus**, counts varying from 30 to 110.000 per ml of milk.

Two-hundred and one strains were isolated, of which 98,5% formed yellow pigment on simple agar, 87,1% produced acetoin, 97,5% utilized maltose, 94,0% utilized manitol; while 70,6% formed yellow pigment and 27,9% violet pigment on crystal violet agar, behaving thus, as strains of probable human or bovine origin.

Regarding fibrinolysin and coagulase tests in human and bovine plasma, 31,8% were considered of probable human origin and 13,9% probable bovine origin. The remainder were considered as tending to be or not of either human or bovine origin.

Regarding phage-typing 17,4% and 11,4% of strains were not typable by the International Basic Set Human and Bovine, respectively. Among typable strains those sensitive to Group III (33,8%) and III/NC (15,9%) of the International Basic Set Human and to phages of groups III (16,9%), IV (17,4%) and III/IV (12,4%) of the Basic Set Bovine predominated. There was great variability regarding phage-types of the *S. aureus* isolated, many of which were lysed by a higher number of phages of both sets.

Associating results of fibrinolysin tests, coagulase in human and bovine plasma and phage-typing, according to criteria established, 19,9% of strains were considered of probable human origin, 10,4% bovine and 17,9% and 27,9% intermediate, with tendency to be of human and bovine origin, respectively; it was impossible to determine the probable origin of 23,9% of strains that were considered intermediate without tendency.

Production of enterotoxin was demonstrated in one strain isolated from a sample of milk which showed a 860/ml count and enterotoxin produced was type B and the probable origin of the strain was human.

Results obtained show that both bovine and human species had an important participation in the contamination of milk by *S. aureus* in the present paper.

INTRODUÇÃO

É bem conhecida a importância do leite na nutrição humana, sendo considerado um alimento quase completo por conter em sua composição, proteínas, gordura, açúcares, sobretudo a lactose, sais minerais, ácidos orgânicos, vitaminas e outros nutrientes. Assim sendo, constitui-se também em um excelente meio de cultura para microrganismos (BEHMER¹¹, 1980), os quais podem ocasionar alterações do produto ou riscos aos seus consumidores.

A sua utilização como alimento pode ser feita, fundamentalmente, através do seu consumo como leite líquido ou de produtos derivados, como queijos, manteiga e coalhadas. Pode também ser consumido através de alimentos em cuja composição é incluído o leite e/ou creme de leite, tais como sorvetes, produtos de confeitaria e outros.

O leite quando secretado por vacas sadias é estéril podendo, porém, contaminar-se com microrganismos que estão presentes normalmente nos ductos lactíferos que, segundo LESER & PAIM⁹⁹ (1975), constituem sua flora microbiana normal. Esses microrganismos, geralmente bactérias pertencentes a alguns poucos gêneros, acham-se presentes em pequeno número no interior da glândula mamária, predominando os micrococos, estreptococos e bacilos difteróides (OLSON & MOCQUOT¹²⁰, 1980). Entretanto, durante e após a ordenha, o leite é passível de ser contaminado também com microrganismos provenientes da ordenhadeira mecânica, do ar, da água utilizada na limpeza de utensílios como baldes e la

tões, que podem ocasionar alterações do produto.

Por outro lado, os animais doentes podem veicular ao leite bactérias patogênicas como *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus*. O leite pode ser contaminado com esses microrganismos pela sua eliminação através da glândula mamária, em casos de mastite estreptocócica ou estafilocócica, ou através do meio ambiente pela presença no rebanho de animais com brucelose, tuberculose ou salmonelose. Deve ser ressaltada, ainda, a importância dos animais portadores na transmissão de agentes patogênicos através do leite (COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN HIGIENE DE LA LECHE³⁷, 1971).

O leite pode contaminar-se, também, com outros diferentes microrganismos patogênicos como *S. aureus*, *Salmonella typhi* e *S. paratyphi*, *S. schottmülleri*, *S. hirschfeldii*, *Shigella* sp., e *Escherichia coli* enteropatogênica, a partir de ordenhadores e outros manipuladores desse alimento (KAPLAN e cols⁹³, 1962).

O leite cru pode veicular microrganismos patogênicos ao homem, mesmo que suas características organolépticas se apresentem inalteradas, sendo a sua presença e a quantidade relacionadas às condições higiênicas a que o produto é submetido durante a obtenção e transporte da fazenda a um posto de resfriamento ou à usina de pasteurização. No processo de pasteurização, submete-se o leite a um tratamento térmico controlado visando, principalmente, a destruição de microrganismos patogênicos (SPREER¹⁴⁴, 1975; PINEIRO¹²⁵, 1977; BEHMER¹¹, 1980). Entretanto, eventualmente, tais agentes poderão permanecer ainda viáveis, ou mesmo

pode ocorrer recontaminação do leite quando o processo de pasteurização não for conduzido adequadamente. Assim sendo, os produtos derivados do leite poderão, também, apresentar-se com microrganismos patogênicos (KAPLAN e cols⁹³, 1962). Cumpre ainda salientar, que mesmo a pasteurização sendo conduzida de forma adequada pode-se ter um produto higienicamente de má qualidade, pois o leite recebido dos locais de produção para ser beneficiado nas usinas, pode mostrar-se com elevado grau de contaminação (NASCIMENTO¹¹⁷, 1982).

Do exposto depreende-se que, agentes causadores de doenças tais como a tuberculose, brucelose, estreptococcias, intoxicação por enterotoxina estafilocócica, salmoneloses e Febre Q, podem ser veiculados ao homem através do leite e derivados (LEÃO⁹⁸, 1937; KAPLAN e cols⁹³, 1962), podendo, ainda, serem veiculados agentes de viroses como o vírus da hepatite infecciosa e da poliomielite (OLSON & MOCQUOT¹²⁰, 1980).

Por essas razões, deve-se ter uma preocupação constante relativa às operações de ordenha, beneficiamento, distribuição e comercialização do leite, a fim de ser fornecido ao consumo humano, um produto em condições adequadas, do ponto de vista higiênico-sanitário. Por outro lado é, também, importante para o conhecimento de aspectos epidemiológicos relacionados a doenças transmitidas através de alimentos, incluindo o leite, o estudo da presença e quantidade de microrganismos patogênicos ao homem.

Dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite, pode-se destacar o *Staphylococcus aureus*, microrganismo capaz de provocar doenças no homem e nos ani

mais e que, através dos alimentos, pode ser responsabilizada por casos de intoxicação alimentar.

O primeiro isolamento dessa bactéria em cultura pura foi realizado por Rosenbach em 1884, que a denominou genericamente *Staphylococcus*, sendo posteriormente sugerida a existência de duas espécies, com base na pigmentação amarela ou branca das colônias, denominadas *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus*; em 1885, Passet propôs uma terceira espécie, o *Staphylococcus pyogenes citreus* (WILSON & MILES¹⁵⁸, 1975).

Atualmente, no gênero *Staphylococcus* da família *Micrococcaceae*, consideram-se as seguintes espécies: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (BAIRD-PARKER⁹, 1974). De acordo com esta classificação, as bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem cocos Gram-positivos, agrupados em forma de cacho de uva podendo, também, apresentar-se aos pares ou em cadeias curtas; são imóveis, não formam esporos, produzem catalase e utilizam a glicose, tanto em aerobiose como em anaerobiose com produção de ácido. Além de possuir as características do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* é também produtor de enzimas, dentre as quais destacam-se a coagulase e a termonuclease (BAIRD-PARKER⁹, 1974) e exotoxinas, sendo de importância salientar a enterotoxina estafilocócica, produzida por algumas cepas dessa bactéria e que é responsável por casos de intoxicação alimentar, caracterizada por distúrbios gastrintestinais agudos (DACK⁴¹, 1964; FRAZIER & WESTHOFF⁵⁸, 1978).

Relativamente à produção de nuclease termo-estável, LACHICA e cols⁹⁷, (1971), descreveram um método simples e rápido para sua detecção, utilizando ágar DNA-azul

de toluidina em lâmina e consideram ser esta uma prova muito importante na caracterização do *Staphylococcus aureus*, a qual é também recomendada por diversos pesquisadores (VICTOR e cols¹⁵⁰, 1969; BARRY e cols¹⁰, 1973; SPERBER & TATINI¹⁴³, 1975; DELAZARI & LEITÃO⁴⁷, 1976; ZARZOUR & BELLE¹⁶⁰, 1978; GASPAR JR.⁶³, 1982).

Segundo COURTER & GALTON³⁹, (1962) o *S. aureus* é um microrganismo ubiquitário encontrado em diferentes tecidos animais, ou contaminando alimentos expostos ao contato com o homem e animais. Segundo esses autores, estudos têm demonstrado que existem fortes argumentos quanto à transmissão de *S. aureus* entre o homem e os animais sendo, porém, de difícil comprovação, dada a dificuldade em se identificar a fonte de infecção humana ou animal.

No homem e nos animais o *S. aureus* é responsável por processos inflamatórios supurativos que determinam necrose e formação de abscesso, podendo, em alguns casos, ocorrer uma septicemia grave e desenvolverem-se infecções metastáticas em diferentes órgãos (WILSON & MILES¹⁵⁸, 1975; SMITH e cols¹³⁹, 1971). Todavia, a presença de *S. aureus* em tecidos animais nem sempre está associada a processos patológicos característicos, pois sabe-se da ocorrência de indivíduos com infecções estafilocócicas assintomáticas localizadas, principalmente, nas fossas nasais e em diferentes áreas da pele (WILSON & MILES¹⁵⁸, 1975).

Segundo McFARLAN¹⁰⁷ (1938); GILLEPSIE e cols⁷⁰, (1939) e ROUNTREE & BARBOUR¹³⁵ (1951), a proporção de portadores de *S. aureus* nas fossas nasais varia de 30,0% a 60,0%. Em estudos realizados em indivíduos assintomáticos WILLIAMS¹⁵⁴ (1946) e MARTIN & WHITEHEAD¹⁰⁶ (1949), observa-

ram, respectivamente, que 40,0% e 14,0% eram portadores de *S. aureus* isolados das mãos. Mais recentemente IARIA e cols⁸⁵, (1980), pesquisando a ocorrência de *S. aureus* em fossas nasais de 34 manipuladores de alimentos verificaram que 12 (35,3%) eram portadores dessa bactéria, dos quais 2 (16,7%) albergavam *S. aureus* produtores de enterotoxina estafilocócica. ZELANTE e cols¹⁶², (1982), pesquisando a presença de portadores em 130 pessoas clinicamente sadias, encontraram 47 (36,15%) indivíduos com *S. aureus* nas narinas e boca. Em outro estudo, ZELANTE e cols¹⁶³, (1983), verificaram que portadores bucais de *S. aureus* podem albergar cepas enterotoxigênicas, pois de 25 cepas isoladas de cavidade bucal, uma foi produtora de enterotoxina do tipo C. CASTRO & IARIA³¹ (1984), observaram que de 78 manipuladores de alimentos em cozinhas de 8 hospitais do Município de João Pessoa, Paraíba, 33 (42,3%) revelaram-se portadores de *Staphylococcus aureus* no vestíbulo nasal, sendo 5 (6,4%) indivíduos positivos para cepas produtoras de enterotoxina.

A partir de manipuladores infectados com *S. aureus*, com ou sem sintomas, pode ocorrer a contaminação de utensílios, equipamentos e alimentos (HOBBS & GILBERT⁸², 1978), devendo-se levar em conta também que animais podem constituir-se em fonte de contaminação por essa bactéria (MORRISON e cols¹¹³, 1961). Segundo o ICMSF⁸⁶ (1978), o encontro de *S. aureus* em alimentos pode significar que ocorreu contaminação por essa bactéria originada de fossas nasais, boca e pele de manipuladores, assim como de equipamentos e de produtos crus de origem animal.

É importante salientar que a contaminação dos alimentos por *S. aureus* pode ter sua origem nas próprias va

cas ordenhadas. Embora a mastite bovina seja devida comumente a bactérias como *Streptococcus agalactiae*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium pyogenes* e com menor freqüência a *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides* e *Mycoplasma* sp. (OLSON & MOUQUOT¹²⁰, 1980), segundo GEORGE e cols⁶⁴, (1962) dado o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de vacas acometidas de mastite, tornou-se crescente a ocorrência dessa doença produzida por *S. aureus* resistentes a vários antibióticos. Porém, REID & WILSON¹³⁰ (1959) salientam que o *S. aureus* está relacionado a casos agudos e crônicos de mastite em bovinos, mas que, também, pode ser isolado de leite de vacas normais. Segundo SPENCER & LASMANIS¹⁴² (1952) e DAVIDSON⁴⁴ (1961), isto ocorre porque a pele que recobre a glândula mamária é uma das principais fontes de contaminação do leite com essa bactéria. A ocorrência de bovinos portadores de *S. aureus* também foi evidenciada por HAJEK & MARSALEK⁷³ (1969), os quais, examinando 667 animais, constataram que 80 (12%) apresentavam essa bactéria nas fossas nasais. Assim sendo, verifica-se que o homem e os animais, com ou sem sintomas, podem albergar o *S. aureus* e contaminar o leite.

Diversos pesquisadores têm evidenciado a presença de *S. aureus* no leite, cru ou pasteurizado e/ou em seus derivados (FERNANDEZ⁵⁷, 1966; GHOSH & LAXIMINARAYANA⁶⁵, 1972; GHOSH & LAXIMINARAYANA⁶⁶, 1974; WILSON¹⁵⁷, 1977; AHMED e cols¹, 1978; GOMEZ e cols⁷², 1979; CABRAL e cols²⁵, 1983; CERQUEIRA-CAMPOS e cols³³, 1983; FURLANETTO e cols⁶¹, 1983).

De forma geral, estando presente em alimentos, o *S. aureus* pode multiplicar-se e atingir números elevados, porém, algumas características fisiológicas dessa bactéria,

que serão apresentadas a seguir, são importantes para que isso possa ocorrer.

Segundo FRAZIER & WESTHOFF⁵⁸ (1978), o *S. aureus* multiplica-se em meios com pH mínimo de 4,8 enquanto BAIRD-PARKER⁹ (1974) refere que tal multiplicação pode ocorrer quando o pH encontra-se na faixa de 4,2 a 9,3 sendo o ótimo entre 7,0 e 7,5. Essa bactéria pode multiplicar-se quando a atividade de água (a_w) do alimento atinge até o valor mínimo de 0,86 (JAY⁸⁸, 1973) tendo-se, porém, maior crescimento na faixa entre 0,980 e 0,995; em a_w de 0,999, ocorre menor crescimento e em 0,84 a multiplicação é inibida (TROLLER & CHRISTIAN¹⁴⁹, 1978).

Deve-se salientar que o leite pode apresentar-se com a_w de 0,980 (TROLLER & CHRISTIAN¹⁴⁹, 1978; CHRISTIAN³⁵, 1980) e pH de 6,3 a 6,5 segundo JAY⁸⁸ (1973) e de 6,8 a 7,0 de acordo com CORLETT & BROWN³⁸ (1980).

Relativamente à temperatura, BAIRD-PARKER⁹ (1974) salienta que o *S. aureus* pode multiplicar-se numa faixa de temperatura que varia de 6,5 a 46°C, sendo a ótima a de 30 a 37°C.

Por outro lado, FRAZIER & WESTHOFF⁵⁸ (1978), destacam que pode ocorrer produção de enterotoxina em temperaturas de 15,6 a 46°C, sendo a faixa ótima a de 21 a 36°C. Porém, referem que quanto mais favorável for o alimento para a multiplicação dessa bactéria, mais amplas são as faixas de temperatura e pH que permitem o seu crescimento.

É importante considerar-se que, em nosso meio, o leite após a ordenha, freqüentemente é mantido em temperatura ambiente e, portanto, em condições não adequadas para

sua conservação.

Diante disto, levando em conta as características acima referidas, aliadas à disponibilidade de nutrientes e à temperatura, o leite permite a multiplicação de S. aureus, que pode atingir números elevados e, se for enterotoxigênico, poderá, durante o seu crescimento, produzir enterotoxina estafilocócica.

MINOR & MARTH¹¹² (1972) em um trabalho de revisão, referem que cepas de S. aureus produtoras de enterotoxina podem ser constatadas, tanto em amostras de leite colhidas diretamente do úbere de vacas com mastite, quanto das obtidas em latões que chegam à plataforma da usina de pasteurização, bem como de produtos derivados.

A intoxicação alimentar, causada pela enterotoxina estafilocócica, foi identificada por Vaughan (citado por DACK⁴¹, 1964), após ingerir experimentalmente queijo que havia se mostrado envolvido em surto de intoxicação. Posteriormente, Barber em 1914 (citado por JAY⁸⁸, 1973), reproduziu os sintomas da doença, ingerindo leite contaminado com S. aureus.

Essa intoxicação ocorre pela ingestão de alimentos contendo enterotoxina produzida por cepas de Staphylococcus coagulase-positivas, mas nem todas as cepas coagulase-positivas são enterotoxigênicas (EVANS⁵⁵, 1948; EVANS e cols⁵⁶, 1950). Entretanto, deve ser salientado que algumas cepas coagulase-negativas já se revelaram produtoras de enterotoxina estafilocócica (Dolman, 1942 citado por DACK⁴¹, 1964 e BERGDOLL e cols¹⁶, 1967).

Os sintomas mais freqüentes observados na inin

toxicação alimentar estafilocócica ocorrem 1 a 6 horas (DACK⁴¹, 1964) após a ingestão do alimento e se revelam por sialorréia, náusea, vômito, diarreia e comumente hipotermia (DACK⁴¹, 1964 e FRAZIER & WESTHOFF⁵⁸, 1978). É uma doença de alta morbidade; porém de baixa letalidade, (GILBERT⁶⁷, 1974) e os indivíduos acometidos geralmente recuperam-se num período que varia de 1 a 3 dias (DACK⁴¹, 1964).

Vários alimentos têm sido relacionados a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, tais como: carne bovina, frangos, lagosta, camarão, peixe, presunto, produtos cárneos embutidos, leite e derivados e outros alimentos em cuja composição estão presentes o leite ou seus derivados, como queijos, sorvetes e produtos de confeitaria (DACK e cols⁴², 1930; KELLY & DACK⁹⁵, 1936; SIMKOVICOVA & GILBERT¹³⁸, 1971; BRACHMAN e cols²¹, 1973; GILBERT & WIENEKE⁶⁸, 1973; JAY⁸⁸, 1973; GILBERT⁶⁷, 1974; JENNINGS⁸⁹, 1975; HOBBS & GILBERT⁸², 1978). JENNINGS⁸⁹ (1975) baseado em estudos epidemiológicos, refere alguns alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica e respectivas frequências: carne (40,0%), aves (21,8%), produtos recheados com creme (13,7%), peixes e ostras (5,9%), batatas e macarrão (5,5%), leite e derivados (3,7%), ovos e derivados (2,6%) e outros alimentos (6,3%).

Atualmente são conhecidos 6 tipos sorológicos de enterotoxina denominados: A (CASMAN e cols²⁹, 1963), B (BERGDOLL e cols¹⁷, 1971), C (BERGDOLL e cols¹⁵, 1965), D (CASMAN e cols³⁰, 1967), E (BERGDOLL e cols¹⁷, 1971) e F (BERGDOLL e cols¹⁸, 1981). Este último tipo de enterotoxina estafilocócica, capaz de promover, experimentalmente, vômito e diarreia em macacos foi evidenciado pela primeira

vez por BERGDOLL e cols¹⁸ (1981), a partir de cepas de *S. aureus* isoladas, principalmente, de mucosa vaginal de mulheres acometidas de um síndrome de choque tóxico (Toxic-Shock-Syndrome - TSS). Esses autores referem que o TSS está estreitamente relacionado ao uso de tampões vaginais no período menstrual, e causando sintomatologia similar ao da intoxicação alimentar estafilocócica, acrescida de febre alta, eritema de pele, edema das extremidades, hipotensão e insuficiência renal.

É importante referir, porém, que uma mesma cepa de *S. aureus*, pode ser produtora de mais de um tipo de enterotoxina (JENNINGS⁸⁹, 1975; GILBERT & WIENEKE⁶⁸, 1973; DELAZARI & LEITÃO⁴⁷, 1976; CABRAL e cols²⁵, 1983; CASTRO & IARIA³¹, 1984).

Quanto à sua composição, as enterotoxinas dos tipos A a E são constituídas por uma cadeia única polipeptídica, contendo lisina, ácido glutâmico, ácido aspártico e tirosina, com peso molecular variando de 28.000 a 35.000 daltons (GILBERT⁶⁷, 1974). A enterotoxina F, é referida por BERGDOLL e cols¹⁸, (1981), como sendo de composição proteica e apresentando peso molecular de 20.000 daltons.

Uma característica importante da enterotoxina estafilocócica é a sua termo-resistência pois ela pode resistir à fervura por 20 a 60 minutos e, até mesmo, à autoclavagem a 120°C durante 15 minutos (SURGALLA & HITE¹⁴⁷, 1945; DACK⁴¹, 1964; JAY⁸⁸, 1973); porém, segundo, JAY⁸⁸ (1973) tal resistência pode ser maior nos alimentos do que em condições experimentais em ensaios em laboratório.

Assim sendo, no leite mantido por algumas horas em temperaturas que permitam a multiplicação de *S. aureus*, pode-se encontrar quantidades significativas de enterotoxina e, embora os processos de pasteurização e de desidratação destruam a maioria ou todos os estafilococos, não inativa a enterotoxina produzida (ICMSF⁸⁶, 1978).

A este respeito, já foram relatados alguns surtos de intoxicação alimentar estafilocócica relacionados à ingestão de leite em pó reconstituído que não continha estafilococos viáveis (ANDERSON & STONE², 1955; ARMIJO e cols⁴, 1957; DICKIE & THATCHER⁴⁹, 1967).

Quanto ao processo de esterilização do leite em que se utiliza tempo e temperatura suficientes para destruir microrganismos, pode haver a inativação de parte da enterotoxina B produzida nesse alimento cru. Porém, tal tratamento térmico não é totalmente seguro para evitar a presença dessa enterotoxina em níveis capazes de ocasionar intoxicação em consumidores (READ & BRADSHAW¹²⁷, 1966), sendo esse fato também demonstrado com relação à enterotoxina do tipo A (DENNY e cols⁴⁸, 1966).

No diagnóstico laboratorial de um surto de intoxicação alimentar estafilocócica, é importante a verificação da presença da enterotoxina nos alimentos suspeitos (DACK⁴¹, 1964). Nos primeiros métodos utilizados para essa finalidade, realizava-se a ministração a macacos, de filtrados de culturas de *S. aureus* por vias oral e endovenosa (JORDAN & McBROOM⁹², 1931; WOOLPERT & DACK¹⁵⁹, 1933; DACK e cols⁴³, 1935; DAVISON e cols⁴⁶, 1938) e a gatos, por vias endovenosa e intraperitoneal (DOLMAN e cols⁵¹, 1936; DOLMAN

& WILSON⁵⁰, 1938; DAVISON e cols⁴⁶, 1938; RIGDON¹³¹, 1938). Posteriormente, foram também utilizadas rãs, empregando-se a ministração oral de enterotoxina (ROBINSON¹³⁴, 1949; EDY⁵³, 1951) e outros animais como ratos, camundongos, cobaias, cães no vos, leitões e canários (DACK⁴¹, 1964). Posteriormente, de vido aos custos na aquisição e manutenção dos animais utili zados, às dificuldades no seu manuseio e na interpretação dos resultados, decorrentes das variações de sensibilidade e especificidade, foram estudados e desenvolvidos métodos imunológicos para a detecção de enterotoxina estafilocócica.

Para se fazer a pesquisa de enterotoxina em alimentos, deve-se realizar a extração desse produto tóxico seguida da sua concentração e, para isto, podem ser empregados os processos estudados por diferentes autores como HALL e cols⁷⁸, (1963); CASMAN & BENNETT²⁸ (1965); READ e cols^{128,129} (1965) e o de CASMAN²⁶ (1967) modificado por GILBERT e cols⁶⁹, (1972) e GILBERT & WIENEKE⁶⁸ (1973).

Atualmente, para a verificação da presença de enterotoxina em extratos obtidos a partir de alimentos ou de culturas de cepas de *S. aureus* podem ser utilizados os métodos de imunofluorescência (HOPPER⁸³, 1963; FRIEDMAN & WHITE⁶⁰, 1965); inibição da hemaglutinação (ROBINSON & THATCHER¹³³, 1965; MORSE & MAH¹¹⁴, 1967), difusão simples em ágar (HALL e cols⁷⁸, 1963), radioimunoensaio em fase só lida (JOHNSON e cols⁹¹, 1971; BENNETT e cols¹², 1973; BUKOVIC & JOHNSON²⁴, 1975), dupla difusão de Oakley em tubo ou de Ouchterlony em placas, (GILBERT⁶⁷, 1974; ROBBINS e cols¹³², 1974), dupla difusão em ágar em lâmina de WADSWORTH¹⁵² (1957) e de CROWLE⁴⁰ (1958) e o método imunoenzimático (ELISA) - Enzyme-Linked Immunosorbent (STIFFLER-ROSENBERG & FEY¹⁴⁵,

1978; BERDALL e cols¹³, 1981).

A produção de enterotoxina a partir de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos tem sido objeto de estudos realizados por vários pesquisadores como HALLANDER⁷⁹ (1965), CASMAN & BENNETT²⁷ (1963) e DONNELLY e cols⁵² (1967).

SIMKOVICOVA & GILBERT¹³⁸ (1971) realizaram um estudo comparativo das técnicas preconizadas por esses pesquisadores e obtiveram pelo método de HALLANDER⁷⁹ (1965), que envolve a cultura de *S. aureus*, por até 72 horas a 35°C, sobre uma camada de celofane colocada na superfície de ágar nutritivo em placas de Petri, quantidades de enterotoxina inferiores a 0,6 µg/ml de extrato. Por outro lado, com os métodos de CASMAN & BENNETT²⁷ (1963) e de DONNELLY e cols⁵², (1967), que são processos nos quais se utiliza a cultura em saco de celofane, constataram após 48 horas de incubação a 35°C, níveis de enterotoxina de 60 µg/ml nos extratos obtidos. Tendo em vista os seus resultados, estes autores optaram pelo método de DONNELLY e cols⁵², (1967) pela facilidade no preparo do material, na inoculação da cepa de *S. aureus* em estudo, na recuperação da suspensão e também pelos níveis elevados de enterotoxina produzidos.

No Brasil, alguns pesquisadores têm evidenciado a ocorrência de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, produtoras de enterotoxina estafilocócica. DELAZARI & LEITÃO⁴⁷ (1976), constataram, em amostras de macarrão, cepas produtoras dos tipos A, B, C, D e E e da combinação dos tipos A e B. RUDGE¹³⁶ (1980), a partir de amostras de lingüiça fresca isolou cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxina dos tipos A e C. IARIA⁸⁴ (1981) verificou em 100

amostras de doces cremosos a presença de *S. aureus* em 38,0%, tendo isolado cepas enterotoxigênicas de 7% do total examinado. HIROOKA & MÜLLER⁸¹ (1982) analisaram amostras de produtos cárneos embutidos e das 75 cepas de *S. aureus* isoladas, 42,7% revelaram-se produtoras de enterotoxina estafilocócica dos tipos A, B, C, E e AC concomitantemente. CABRAL e cols²⁵, (1983) evidenciaram que em 50 amostras de queijo coalho, 34 (74%) apresentaram-se positivas para *S. aureus*, sendo 9 (18%) positivas para cepas enterotoxigênicas dos tipos A, B, AC e AE em associação. CERQUEIRA-CAMPOS & IARIA³², (1983) em 50 amostras de carne moída observaram que 22 (44%) eram positivas para *S. aureus*, sendo 5 (10%) positivas para cepas produtoras de enterotoxina dos tipos A, B, D e e CD.

Em outros países, como Espanha (FERNANDEZ⁵⁷, 1966), Estados Unidos (CARMAN e cols³⁰, 1967), Índia (GHOSH & LAXMINARAYAMA⁶⁵, 1972 e KUMAR & GUPTA⁹⁶, 1983), Inglaterra (WIENEKE¹⁵³, 1974), Egito (AHMED e cols¹, 1978), Japão (KATO & KUME⁹⁴, 1980) e Hungria (LOMBAI e cols¹⁰³ (1980), em amostras de leite e seus derivados, foi demonstrada a presença, em percentagens variáveis, de cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras dos diferentes tipos de enterotoxina estafilocócica.

OLSON e cols¹¹⁹, (1970) nos Estados Unidos e Canadá, GARCIA e cols⁶², (1980) na Espanha e TAKESHIGE e cols¹⁴⁸, (1983) no Japão, constataram a ocorrência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas no leite de vacas com mastite, sendo a maioria das cepas isoladas produtoras da enterotoxina do tipo C. OLSVIK e cols¹²¹, (1981) na Noruega,

pesquisando a capacidade enterotoxigênica das cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes espécies animais, observaram que as de origem bovina, eram, em sua maioria, produtoras de enterotoxina do tipo C. Entretanto, HAJEK & MARSALEK⁷⁷ (1973) na Hungria; testaram a capacidade produtora de enterotoxina dos tipos A, B e C, de cepas de *S. aureus* isoladas do ~~homem~~ e animais e verificaram que as que se comportaram, frente às provas bioquímicas e de fagotipagem, como sendo de biótipos de origem animal, raramente produziam esse tipo de enterotoxina, ao contrário das que apresentavam comportamento de biótipos de origem humana.

Deve ser salientado que as cepas de *S. aureus* presentes no leite cru podem ter como origem o homem ou o próprio animal. A este respeito, há muito vêm sendo realizadas investigações nas quais tenta-se, através de provas laboratoriais, caracterizar as cepas de *S. aureus* isoladas como pertencentes a biótipos de origem humana ou bovina. Para isto, vários autores têm submetido cepas de *S. aureus* isoladas do homem, de bovinos e de outros animais, às provas de produção de pigmento, hemolisinas, fosfatase, coagulase em plasma específico, fibrinolisinase, de crescimento em meio contendo cristal violeta, de utilização de carboidratos e também à provas de fagotipagem.

Assim, FREITAS e cols⁵⁹, (1965), HAJEK & MARSALEK^{73,76} (1969 e 1971) e ASHCAR^{5,6} (1969 e 1974), verificaram que a maioria das colônias de cepas de *S. aureus* de origem canina apresentavam pigmentação branca, enquanto que, segundo ASHCAR^{5,6} (1969 e 1974), as de origem humana apresentavam em sua maioria ou a totalidade, colônias com pigmentação amarela. HAJEK & MARSALEK⁷³ (1969) constataram que

a maioria das colônias de cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite e de bovinos assintomáticos, revelaram-se com pigmentação amarela. Observações semelhantes, foram feitas por TAKESHIGE e cols¹⁴⁸ (1983), os quais verificaram que 75 (86,2%) cepas de *S. aureus*, de 87 isoladas de leite de vacas com mastite, produziam, também, colônias com pigmento amarelo.

Com relação à capacidade hemolítica, GLENNY & STEVENS⁷¹ (1935) e BRYCE & ROUNTREE²³ (1936), utilizando ágar sangue preparado com hemácias de coelho e de carneiro, evidenciaram a existência de dois tipos de hemolisinas produzidas pelos estafilococos, denominadas α e β . A hemolisina β tem a propriedade de hemolisar hemácias de carneiro, mas não as de coelho, enquanto que a hemolisina α lisa am os dois tipos de hemácias, e é neutralizada especificamente pela anti-hemolisina α . Posteriormente, outras duas hemolisinas foram descritas denominadas de Δ (WILLIAMS & HARPER¹⁵⁵, 1947) e ϵ (ELEK & LEVY⁵⁴, 1950), sendo esta última produzida principalmente por cepas de estafilococos coagulase-negativas.

Em estudos realizados, nos quais se utilizaram anti-hemolisinas específicas, foram observadas sete possibilidades, quanto à produção de hemolisinas por cepas de *S. aureus*, isoladas de leite, a saber: α , β , Δ , $\alpha\beta$, $\alpha\Delta$, $\beta\Delta$ e $\alpha\beta\Delta$ (JASPER & JAIN⁸⁷, 1966; LOKEN & HOYT¹⁰², 1962). Estes dois últimos pesquisadores observaram que de 479 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas acometidas de mastite, 62,4% produzia, simultaneamente, hemolisinas β e Δ , 22,1% α , β e Δ e 1,9% α e β , enquanto que, 10,6% produzia somente a hemolisina do tipo β , sendo esta, portanto, elaborada

por mais de 95% da totalidade das cepas estudadas. Segundo ELEK & LEVY⁵⁴ (1950), a hemolisina β é característica das cepas de origem animal e raramente produzida por cepas de origem humana, as quais elaboram, principalmente, a hemolisina do tipo α . TAKESHIGE e cols¹⁴⁸, (1983), estudaram 87 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, e verificaram que 60 (69,0%) produziam a hemolisina α , 83 (95,4%) a β e 58 (66,6%) a Δ , isoladamente ou em associação.

As cepas de *S. aureus* isoladas de bovino, em sua maioria, produzem acetoina e fosfatase e utilizam o manitol em aerobiose e anaerobiose e a maltose em aerobiose (BROWN e cols²², 1967; TAKESHIGE e cols¹⁴⁸, 1983). Comportamento similar foi também demonstrado por ASHCAR^{5,6} (1969 e 1974) para cepas de origem humana. Porém, este autor salienta que a maioria das cepas isoladas de cães por ele estudadas, não se revelou produtora de acetoina, não utilizou a maltose em aerobiose e o manitol em aerobiose e anaerobiose.

Uma outra prova utilizada para diferenciar cepas de *S. aureus* de origem humana, bovina e canina é a de produção de coagulase empregando-se plasma humano e bovino. A este respeito, MEYER¹⁰⁹ (1966) e HAJEK & MARSALEK^{73,74} (1969), observaram que as cepas de origem bovina por eles estudadas coagulavam ambos os plasmas, ao passo que as de origem canina coagulavam apenas o plasma bovino. Segundo MEYER¹⁰⁹ (1966) o *S. aureus* de origem humana coagula o plasma humano mas não o bovino.

Num estudo realizado com cepas de *S. aureus* isoladas de leite e seus derivados, bem como de alimentos que continham leite em sua composição, MEYER¹⁰⁸ (1966) cons

tatou que a maioria coagulava o plasma humano e o bovino.

Outra característica que pode ser pesquisada com relação ao *S. aureus*, é a capacidade de produção de fibrinolisinase pelas cepas de origem humana e animal. A esta filoquinase é uma enzima produzida por alguns *S. aureus* que ativa o plasminogênio ou profibrinolisinase, gerando plasmina ou fibrinolisinase, capaz de dissolver a fibrina (WILSON & MILES¹⁵⁸, 1975).

Segundo CHRISTIE & WILSON³⁶ (1941), as cepas de *S. aureus* de origem animal não produzem fibrinolisinase. Por outro lado, MEYER¹⁰⁸ (1966) e HAJEK & MARSALEK⁷³ (1969) afirmam que a maioria das cepas de origem humana são produtoras de fibrinolisinase, enquanto que as de origem bovina são fibrinolisinase-negativas, confirmando as observações feitas por aqueles autores. Segundo HAJEK & MARSALEK⁷⁵ (1969) as cepas de *S. aureus* de origem humana são primariamente, produtoras de fibrinolisinase, mas a adaptação dessa bactéria ao organismo dos animais induz a inibição dessa propriedade e portanto, comentam esses autores, que a perda da atividade fibrinolítica desse microrganismo é uma característica relacionada a cepas de origem animal. Estes autores, consideram essa prova como um dos critérios mais importantes para a diferenciação de cepas de origem humana e animal, sendo as primeiras fibrinolisinase-positivas e as últimas, negativas (HAJEK & MARSALEK⁷⁶, 1971).

Quanto à prova do cristal violeta, CHAPMAN & BERENS³⁴ (1935) verificaram em meio sólido adicionado desse corante, na concentração de 1:300.000, que o *S. aureus* desenvolve colônias com colorações violeta, amarela ou branca, relacionando as duas primeiras a cepas hemolíticas coa

gulase-positivas e tóxicas para coelhos. MEYER^{111,110} (1967), por outro lado, afirma que a prova do cristal violeta é importante para a diferenciação de cepas de *S. aureus* de origem humana, bovina e canina, cujas colônias em ágar cristal violeta, adquirem cor violeta, amarela e branca, respectivamente. Porém, HAJEK & MARSALEK⁷⁶ (1971) citando vários autores, referem que cepas de *S. aureus* isoladas de processos inflamatórios humanos, produzem colônias de cor violeta e que cepas isoladas de portadores, cerca de 1/3 formam colônias de cor amarela em ágar cristal violeta. Comentam, ainda, que cepas isoladas de casos de mastite bovina produzem colônias de cor amarela, enquanto que, as cepas isoladas de vias aéreas anteriores de bovinos assintomáticos, mostram-se violetas.

ASHCAR⁵ (1969) utilizando as provas de pigmentação, acetoína, maltose e manitol em aerobiose e anaerobiose, para cepas de *S. aureus* de origem humana e canina conclui que, essas bactérias constituem dois grupos, bioquimicamente diferentes um do outro.

Por outro lado, HAJEK & MARSALEK⁷⁶ (1971), afirmam que cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes espécies animais compõem biótipos com características biológicas e bioquímicas diferentes, de acordo com os resultados obtidos nas provas de fibrinolisinase, pigmentação das colônias, coagulação de plasmas humano e bovino, produção de hemolisinas α e β , redução de telurito de potássio, coagulase em lâmina, crescimento em ágar cristal violeta e fagotipagem. Esse fato já havia sido constatado, também, por LEVY e cols¹⁰⁰, (1953) com base nas provas de fibrinolisinase, hemolisinas, pigmentação das colônias e de fagotipagem.

Quanto à fagotipagem, este é um processo de identificação bacteriana através do qual podem-se reconhecer linhagens distintas ou fagótipos de uma mesma espécie de bactéria. Tal método, pode ser de importância em estudos epidemiológicos, permitindo muitas vezes identificar a fonte de infecção e vias de transmissão, fatores importantes no equacionamento de medidas de prevenção (SOLE-VERNIN¹⁴¹ 1976).

Segundo WILLIAMS e cols¹⁵⁶, (1953) para o *S. aureus* a fagotipagem é utilizada em investigações epidemiológicas relacionadas, principalmente, a surtos de intoxicação alimentar e a casos de infecção hospitalar. Para tanto, a Subcomissão de Fagotipagem de Estafilococos ligada ao Centro Internacional de Referência, sediado em Londres (Colindale), estabeleceu, em reunião realizada em Brno, Checoslováquia, em 1974, um conjunto básico de bacteriófagos ao qual as cepas de estafilococos devem ser submetidas (SOLE-VERNIN¹⁴¹, 1976). Porém, embora BLAIR & WILLIAMS²⁰ (1961) considerem que os fagos do Conjunto Básico Internacional para cepas de *S. aureus* de origem humana possam lisar cepas isoladas de bovinos, alguns autores sugerem, para testes com cepas isoladas de leite, a utilização de um conjunto de bacteriófagos obtidos de estafilococos de origem bovina (SETO & WILSON¹³⁷, 1958; NAKAGAWA¹¹⁶, 1960; DAVIDSON⁴⁵, 1961; FERNANDEZ⁵⁷, 1966; MARKHAM & MARKHAM¹⁰⁵, 1966) a fim de se aumentar o índice de tipificação desses microrganismos.

FERNANDEZ⁵⁷ (1966), observou que *Staphylococcus aureus* isolados de leite eram lisados com maior frequência pelos bacteriófagos 42A, 42D, 83A e 81 do conjunto utiliza

do internacionalmente e pelos fagos S2 e S5 da série proposta por SETO & WILSON¹³⁷ (1958). A inclusão destes fagos permitiu um aumento na taxa de tipificação de 77% para 87% em 58 cepas de *S. aureus* estudadas.

MARANDON & OEDING¹⁰⁴ (1966), observaram que cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina produtoras de β hemolisina e fibrinolisinina-negativas eram lisadas pelo bacteriófago 42D, relacionado a cepas de origem bovina.

MARKHAM & MARKHAM¹⁰⁵ (1966), consideram que, para a fagotipagem das cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos, o uso do Conjunto Básico Internacional Humano é de valor limitado, obtendo-se melhores resultados quando se empregam os bacteriófagos do Conjunto Básico Bovino. Esses autores observaram que muitas cepas de origem bovina não eram tipáveis pelo Conjunto Básico Humano a lXRTD (Routine Test Dilution), ao passo que utilizando o Conjunto Básico Bovino, 92% de 388 cepas puderam ser tipadas já com lXRTD.

Como já foi referido, as provas de fagotipagem têm sido também utilizadas no estudo de cepas isoladas de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, tentando-se relacionar o fagótipo de *S. aureus* com a produção de enterotoxina estafilocócica. De acordo com estudos realizados por vários autores como WILLIAMS e cols¹⁵⁶ (1953), PARKER & LAPAGE¹²³ (1957) e MUNCH-PETERSEN¹¹⁵ (1963), as cepas isoladas de alimentos associados a surtos mostraram-se lisáveis, principalmente por fagos do Grupo III do Conjunto Básico Internacional. A este respeito, na Inglaterra, SIMKOVICOVA & GILBERT¹³⁸ (1971), GILBERT & WIENEKE⁶⁸ (1973) e WIENEKE¹⁵³ (1974) verificaram que cepas isoladas de ali

mentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, na sua maioria revelavam-se sensíveis a fagos do grupo III ou I/III; em contraposição, as lisáveis por fagos dos grupos II e IV representavam pequeno número. Porém, segundo ANGELOTTI³ (1969) e GILBERT⁶⁷ (1974), a produção de enterotoxina estafilocócica por cepas de *S. aureus*, não pode ser prevista, a partir, simplesmente, dos resultados das provas de fagotipagem.

Do exposto, pode-se depreender que, embora existam ainda dificuldades quanto a uma caracterização definitiva das cepas de *S. aureus*, em relação à espécie hospedeira de origem, muitos avanços já foram conseguidos relativamente ao problema. Com isto, é necessário que novas investigações sejam realizadas, inclusive em nosso meio, onde inexistem informações relativamente ao comportamento de cepas de *S. aureus* isoladas a partir de leite, frente às provas bioquímicas e de fagotipagem referidas.

OBJETIVOS

Considerando que em nosso meio inexistem informações relativamente ao comportamento de cepas de **S. aureus** isoladas de leite, frente às provas bioquímicas, de fagotipagem e de produção de enterotoxina referidas no capítulo anterior, planejou-se a realização da presente pesquisa com a finalidade de atingir os seguintes objetivos:

1. Constatar a presença e número de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru.
2. Verificar a capacidade enterotoxigênica das cepas de *S. aureus* isoladas.
3. Verificar algumas características das cepas isoladas, com base no seu comportamento frente às provas bioquímicas e de fagotipagem e tentar a determinação de sua origem provável, humana ou bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras de leite

As amostras de leite foram obtidas na plataforma de recepção da usina de pasteurização de leite do Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias "Fernando Costa" (CIZIP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Município de Pirassununga, Estado de São Paulo.

Foram colhidas, em tubos esterilizados de 18 x 180 mm, 100 amostras de leite de latões transportados até a plataforma da usina por caminhões e provenientes das 5 linhas de leite existentes naquele Município.

Tais amostras foram colhidas ao acaso, no dia 13 de fevereiro de 1981 e em números de 12 (54,5%), 2 (100,0%), 21 (58,3%), 31 (72,1%) e 34 (73,9%), correspondentes a 22 latões da linha a, 2 da b, 36 da c, 43 da d e 46 da e, respectivamente. Tomou-se o cuidado de colher, no mínimo, uma amostra de 20 ml de leite de cada propriedade. Os tubos contendo a amostra de leite foram identificados pelo número de registro da respectiva propriedade, acrescentando-se uma letra quando se colhia mais de uma amostra da mesma origem.

O número de amostras colhido, em relação às propriedades e à respectiva produção de leite em litros e em número de latões, segundo as diferentes linhas, encontra-se distribuído no quadro 1.

QUADRO 1 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE LEITE COLHIDO NA PLATAFORMA DA USINA DE PASTEURIZAÇÃO DO CIZIP, SEGUNDO A LINHA DE LEITE, NÚMERO DE PROPRIEDADES, DE LATÕES E DE LITROS DE LEITE, PIRASSUNUNGA, SP, 1981.

Linha de leite	Nº de propriedades	Nº de latões	Nº de litros	Nº de amostras colhidas
a	1	22	1.098	12
b	1	2	68	2
c	20	36	1.332	21
d	17	43	1.753	31
e	14	46	1.906	34
Total	53	149	6.157	100

Os tubos contendo as amostras de leite foram colocados em caixa de material isotérmico (Isopor) contendo blocos de gelo, transportados ao laboratório e mantidos nessas condições até a realização do exame microbiológico. O período decorrido entre a colheita das amostras e o início do exame, nunca ultrapassou 24 horas.

A partir de cada amostra foi realizada a contagem de *S. aureus* e a verificação do comportamento das cepas isoladas frente a provas bioquímicas e de fagotipagem, e, também, quanto à sua capacidade produtora de enterotoxina. As técnicas de preparo das soluções e dos meios de cultura empregados, encontram-se descritas em detalhes, no Anexo I.

2. Diluição das amostras

Para cada amostra prepararam-se diluições de cima para baixo de 10^{-1} e 10^{-2} , empregando-se tubos de ensaio de 18 x 180 mm contendo 9 ml de água fosfatada com pH 7,2 esterilizada e preparada conforme a técnica recomendada por JENSEN e cols⁹⁰, (1978).

3. Semeadura inicial das amostras de leite, contagem, isolamento de colônias suspeitas e identificação de *S. aureus*.

Depositava-se 0,2 ml das amostras de leite e de suas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) em placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, sendo o inóculo, a seguir, espalhado em toda a superfície do meio, utilizando-se um bastão de vidro em "L" esterilizado e partindo-se da placa correspondente à maior diluição. As placas, assim semeadas, eram incubadas a 37°C por 24 horas ou, em caso de dúvida quanto ao aspecto das colônias, por 48 horas (ICMSF⁸⁶, 1978). Em seguida, realizava-se, nas placas com 30 a 300 colônias, a contagem do número de colônias de cor negra, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas por halo claro (BAIRD-PARKER⁷, 1962). A seguir, o número de colônias contado era multiplicado por 5 e o resultado multiplicado pelo fator de diluição correspondente à placa utilizada para a contagem, a fim de se obter o número presuntivo de *S. aureus* por mililitro de leite. Efetuava-se o isolamento de colônias da placa de contagem, obtendo-se de 1 a 5 colônias por amostra, as quais eram semeadas em tubos de ágar simples inclinado, sendo estes, a seguir, incubados a 37°C por 24 horas. Com

provando-se a presença de cultura pura de cocos Gram-positivos agrupados em forma de cachos, em cada um dos tubos de ágar simples inclinado, realizava-se a identificação bioquímica das cepas isoladas, através das provas: da catalase, de oxidação-fermentação da glicose, da coagulase em plasma de coelho e da termonuclease.

Após a identificação bioquímica das cepas isoladas, o resultado da contagem presuntiva era confirmado ou corrigido.

3.1 Prova da catalase - (BAIRD-PARKER⁸, 1966).

Para a verificação da produção de catalase as cepas de *S. aureus* eram semeadas em tubos contendo 10 ml de caldo glicosado a 1%. Após incubação a 37°C por 24 horas, adicionava-se a cada tubo 1 ml de solução de água oxigenada a 3% e considerava-se a prova como sendo positiva quando havia desprendimento de bolhas de gás.

3.2 Prova da oxidação-fermentação (O/F) da glicose. (Subcomitê Internacional de Taxionomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus*¹⁴⁶, 1965).

Nesta prova, a partir de culturas em ágar simples inclinado (ao invés de ágar glicose-extrato de levedo triptona) de 24 horas a 37°C, usando-se agulha longa de níquel-cromo, cada cepa em estudo era semeada em picada profunda, em 2 tubos contendo ágar glicose-púrpura de bromocresol para prova de O/F da glicose sendo um deles, logo a se-

guir, adicionado de uma camada de vaselina líquida esterilizada (BAIRD-PARKER⁸, 1966). Estes dois tubos a serem inoculados eram, previamente, mantidos em banho-maria fervente durante 15 minutos, para a eliminação do oxigênio e, a seguir, resfriados em água gelada. Após a inoculação, os tubos eram incubados a 37°C durante 5 dias, realizando-se as leituras a cada 24 horas. Considerava-se o resultado como sendo positivo, quando ocorria a viragem de cor para o amarelo, pela produção de ácido, em aerobiose e anaerobiose.

3.3 Prova de coagulase em tubo - Coagulase livre (ZELANTE¹⁶¹, 1974).

Nesta prova, semeava-se, para cada cepa, 0,25 ml de cultura em caldo infusão de cérebro e coração a 37°C por 24 horas, em tubo contendo 0,5 ml de plasma citratado estéril de coelho, diluído a 1:5. As leituras eram feitas após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação a 37°C, sendo a prova considerada positiva quando ocorria a coagulação do plasma.

3.4 Prova da termonuclease - (LACHICA e cols⁹⁷, 1971).

Para a realização desta prova de difusão em ágar, depositavam-se 3 ml de ágar DNA-azul de toluidina fundido em uma lâmina de microscopia limpa, medindo 26 x 76 mm, de forma a cobrir toda a superfície de um dos lados da lâmina. Após a sua solidificação, usando-se um cilindro metálico adaptado a uma trompa de vácuo por meio de um tubo de borracha, faziam-se 10 orifícios, com cerca de 2 mm de diâmetro cada, na camada de ágar. A seguir, usando-se pipeta

Pasteur, cada orifício era preenchido com cultura de 24 horas em caldo infusão de cérebro e coração a 37°C, da cepa correspondente, aquecida em banho-maria fervente durante 15 minutos, antes da realização da prova. As lâminas eram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 4 horas, no interior de uma cuba de vidro tampada contendo algodão embebido com água a fim de se evitar a desidratação do ágar. A prova era considerada positiva quando se desenvolvia um halo róseo de pelo menos 1 mm em torno do orifício.

4. Comportamento das cepas de *S. aureus* isoladas, frente a provas bioquímicas adicionais.

A partir das cepas isoladas, foram realizadas, também, as provas adicionais de utilização do manitol em aerobiose e anaerobiose e da maltose em aerobiose, de produção de acetoína, pigmentos em ágar cristal violeta e ágar simples, de fibrinolisinase em plasma de coelho e de coagulase em plasmas humano e bovino.

4.1 Prova da utilização de manitol em aerobiose e anaerobiose.

Nesta prova utilizou-se o ágar-manitol-púrpura de bromocresol e a metodologia empregada foi a mesma descrita no item 3.2.

4.2 Prova da utilização da maltose em aerobiose.

Nesta prova empregou-se o ágar-maltose-púrpura de bromocresol e a metodologia foi a mesma utilizada para a prova da oxidação da glicose, descrita no item 3.2.

4.3 Prova de produção de acetoína (PAIK & SUGGS¹²², 1974).

A partir de cultura de 24 horas a 37°C em ágar simples, as cepas em estudo eram inoculadas em tubos contendo 5 ml de caldo para a prova de produção de acetoína (glicose-peptona-fosfato de potássio dibásico), sendo, em seguida, incubados a 37°C durante 48 horas. Após a incubação adicionavam-se 5 ml de reagente de O'Meara, constituído de uma solução aquosa com 40% de hidróxido de potássio e 0,3% de creatina. A seguir, os tubos eram agitados e mantidos em temperatura ambiente. A leitura era realizada após 4 horas e a reação positiva era revelada pelo desenvolvimento de cor rósea, indicando a produção de acetoína (acetil-metil-carbinol).

4.4 Prova da pigmentação das colônias (ASHCAR⁶, 1974).

Nesta prova, as cepas eram semeadas pela técnica do esgotamento em placas de ágar simples, as quais eram, em seguida, incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura da prova consistia na verificação da coloração das colônias, considerando-se apenas as colônias brancas e amarelas, sem se levar em conta as diferentes tonalidades da cor amarela.

4.5 Prova do cristal violeta (MEYER¹¹¹, 1967).

As cepas em estudo eram inicialmente semeadas, por esgotamento, em placas de ágar simples e estas incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, utilizando-se uma alça de níquel-cromo, retirava-se, de uma vez, material de cerca de quinze colônias, correspondentes a uma mesma cepa original, o qual era semeado numa placa de Petri contendo ágar cristal violeta. O inóculo era depositado numa pequena área de 1,2 cm² da superfície do meio, valendo-se, para tanto, de um molde quadriculado colocado sob a placa. Desta forma, semeavam-se em cada placa, vinte e cinco cepas diferentes, sendo, a seguir, realizada a incubação por 24 horas a 37°C. A leitura era feita observando-se a coloração adquirida pelas colônias das diferentes cepas, podendo ocorrer o crescimento de colônias de cores amarela, azul ou branca.

4.6 Prova da fibrinolisisina (CHRISTIE & WILSON³⁶, 1941).

A partir de uma cultura em ágar simples inclinado e utilizando-se agulha de níquel-cromo, as cepas eram semeadas em uma placa de Petri contendo ágar simples adicionado de plasma de coelho. Para isto, utilizava-se o molde quadriculado referido no item 4.5 (LIVE¹⁰¹, 1972), colocado sob a placa de Petri, semeando-se com isto, vinte e cinco cepas de *S. aureus* por placa. A leitura era feita após incubação a 37°C por 24 horas ou, quando necessário por 48 horas, sendo consideradas positivas as cepas que produziam um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano, permanecendo opaco o restante do meio.

4.7 Provas da coagulase em plasma bovino e humano.

Estas provas foram também realizadas em tubos e a metodologia empregada foi a mesma utilizada na prova em plasma de coelho, descrita no item 3.3.

5. Fagotipagem das cepas de *S. aureus* isoladas

A fagotipagem das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, foi realizada na Seção de Fagotipagem do Laboratório de Estreptococos e Estafilococos do Departamento de Parasitologia e Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estas provas foram feitas por gentileza do Prof. Carlos Solé-Vernin, responsável pelo referido Laboratório, o qual está filiado ao Centro Internacional de Fagotipagem localizado em Colindale, Londres.

Para a realização da fagotipagem utilizaram-se 2 conjuntos de bacteriófagos, sendo um composto de 23 fagos, adotado em 1974, após uma reunião realizada em Brno, Checoslováquia, pelo Centro Internacional de Fagotipagem com sede em Colindale, Inglaterra, constituindo o Conjunto Básico Internacional aplicado, obrigatoriamente, para classificação de *S. aureus* de origem humana.

O outro conjunto utilizado, adotado em 1970 pelo Subcomitê Internacional de Fagotipagem, foi constituído de 16 fagos pertencentes ao Conjunto Básico para cepas de origem bovina, sendo 8 deles comuns ao Conjunto Básico Internacional para cepas humanas e 8 exclusivamente para a

fagotipagem de cepas bovinas, 7 dos quais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Veterinário Central do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimento da Inglaterra. O fago 42D do Conjunto de 16 fagos para cepas bovinas utilizado e que no passado integrou o Conjunto Básico Internacional para cepas humanas, pertence à coleção de bacteriófagos do Laboratório de Ribeirão Preto.

Os dois conjuntos de bacteriófagos empregados na fagotipagem das 201 cepas de *S. aureus* isoladas de leite estão relacionados, a seguir, nos quadros 2 e 3.

QUADRO 2 - CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL DE BACTERIÓFAGOS PARA FAGOTIPAGEM DE CEPAS DE *S. aureus* DE ORIGEM HUMANA.

GRUPO	BACTERIÓFAGOS
I	29, 52, 52A, 79, 80
II	3A, 3C, 55, 71
III	6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85
Não classificadas	81, 94, 95, 96

QUADRO 3 - CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL PARA FAGOTIPAGEM DE CEPAS DE *S. aureus* DE ORIGEM BOVINA.

GRUPO	BACTERIÓFAGOS
I	29, 52A
II	3A, 116
III	6, 42E, 53, 75, 84
IV	42D, 102, 107, 117
Miscelânea	78, 118, 119

Nas provas de fagotipagem, empregou-se a técnica recomendada por BLAIR & WILLIAMS²⁰ (1961), submetendo-se, inicialmente as cepas aos diferentes fagos dos 2 conjuntos na concentração de 1 x RTD (Routine Test Dilution), simultaneamente numa mesma placa. Posteriormente, as cepas que não eram lisadas frente a 1 x RTD, eram submetidas a teste com 100 x RTD dos mesmos fagos.

Na composição do fagótipo, para cada cepa, levou-se inicialmente em consideração o resultado da fagotipagem frente à diluição 1 x RTD para os 2 conjuntos de bacteriófagos. O fagótipo foi composto considerando-se o conjunto de fagos, humanos e/ou bovinos, que reagiram, sobretudo naquela diluição. Caso não houvesse nenhum fago dos 2 conjuntos regente a 1 x RTD o fagótipo era então constituído a partir dos resultados frente a 100 x RTD.

6. Critérios para a determinação da origem provável humana ou bovina das cepas de *S. aureus* isoladas.

6.1 Frente às provas de coagulase e fibrinolisinina.

Relativamente à origem provável das cepas de *S. aureus* frente às provas de coagulase em plasmas humano ou bovino e da fibrinolisinina, considerava-se como sendo de origem bovina (B) as que coagulavam o plasma (H) e o bovino (CB) mas não produziam fibrinolisinina (Fib).

As cepas que coagulavam o plasma humano, mas não o plasma bovino e que eram produtoras de fibrinolisinina, eram consideradas como sendo de origem humana (H).

As que não coagulavam o plasma bovino, mas coagulavam o plasma humano e que eram negativas na prova de fibrinolisinina eram consideradas intermediárias, porém com tendência a serem de origem humana (I_H). Por outro lado, as positivas nas 3 provas, acima referidas, eram consideradas como sendo intermediárias com tendência a serem de origem bovina (I_B) (HAJEK & MARSALEK^{73,76}, 1969 e 1971). As cepas com comportamento bioquímico diferente dos acima relacionados, frente às provas de coagulase em plasma humano e bovino e da fibrinolisinina, eram consideradas como intermediárias (I).

O quadro 4 mostra todas as combinações possíveis, frente às 3 provas bioquímicas utilizadas para indicar a origem provável das cepas em estudo, relativamente ao comportamento bioquímico.

QUADRO 4 - CRITÉRIOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ORIGEM PROVÁVEL DAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS, SEGUNDO AS PROVAS DE PRODUÇÃO DE COAGULASE EM PLASMAS HUMANO E BOVINO E FIBRINOLISINA.

Fibrinolisinina	Coagulase em plasma humano	Coagulase em plasma bovino	Origem provável
-	+	+	Bovina
+	+	-	Humana
-	+	-	Intermediária humana
+	+	+	Intermediária bovina
+	-	+	Intermediária
+	-	-	Intermediária
-	-	-	Intermediária
-	-	+	Intermediária

+ prova positiva; - prova negativa.

6.2 Frente à fagotipagem

Relativamente à origem do *S. aureus*, levando-se em consideração a fagotipagem, frente aos 2 conjuntos de fagos humano e bovino, as cepas que reagiam com fagos exclusivamente do conjunto bovino (B) e aquelas que reagiam com esses mesmos fagos e com fagos comuns aos conjuntos humano e bovino (HB), quer a 1XRTD ou 100XRTD eram consideradas como de origem bovina (ver Figura 1).

FIGURA 1 - BACTERIÓFAGOS PERTENCENTES AOS CONJUNTOS BÁSICOS INTERNACIONAIS HUMANO E BOVINO, SALIENTANDO-SE OS EXCLUSIVAMENTE HUMANO OU BOVINO E OS COMUNS A AMBOS OS CONJUNTOS.

Conjunto Internacional Humano		
52,79,80,3C,55,71		
47,54,77,83A,85,	29,52A,3A,6,42E,53	116,42D,102,107,117
81,94,95,96	75 e 84	78, 118 e 119
Humanos (H)	Humanos e Bovinos (HB)	Bovinos (B)
Conjunto Internacional Bovino		

De forma similar, as cepas que reagiam somente com fagos exclusivamente do conjunto humano (H) e as que reagiam com esses mesmos fagos, e a fagos comuns aos 2 conjuntos, em qualquer diluição, eram consideradas de origem humana (H).

As cepas que reagiam apenas com fagos comuns aos 2 conjuntos (HB) eram tidas como sendo de origem humana ou bovina (HB).

As cepas que a 1XRTD reagiam com fagos exclu

sivamente do conjunto bovino (B) e que a 100XRTD reagem com fagos exclusivamente do conjunto humano (H), eram consideradas como sendo intermediárias com tendência a serem de origem bovina (I_B).

Inversamente, as que reagem a 1XRTD com fagos exclusivamente do conjunto humano e que a 100XRTD reagem, com fagos exclusivamente do conjunto bovino, eram consideradas como sendo intermediárias, porém, com tendência a serem de origem humana (I_H).

As cepas que reagem, numa mesma diluição, com fagos, exclusivamente do conjunto humano e do conjunto bovino (H/B), reagindo ou não com fagos comuns aos 2 conjuntos, eram consideradas intermediárias.

O quadro 5 resume todas as combinações possíveis, relativamente ao comportamento das cepas frente à fagotipagem e indica, para cada uma, a origem provável da cepa.

QUADRO 5 - CRITÉRIOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ORIGEM PROVÁVEL DAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS SEGUNDO A PROVA DE FAGOTIPAGEM.

FAGOTIPAGEM		ORIGEM PROVÁVEL
1XRTD	100XRTD	
B	-	Bovina
-	B	Bovina
B	HB	Bovina
HB	B	Bovina
B/HB	-	Bovina
-	B/HB	Bovina
H	-	Humana
-	H	Humana
H	HB	Humana
HB	H	Humana
H/HB	-	Humana
-	H/HB	Humana
HB	-	Humana ou Bovina
-	HB	Humana ou Bovina
B	H	Int. c/tendência a bovina
B/HB	H	Int. c/tendência a bovina
B	H/HB	Int. c/tendência a bovina
H	B	Int. c/tendência a humana
H/HB	B	Int. c/tendência a humana
H	B/HB	Int. c/tendência a humana
H/B	-	Intermediária
-	H/B	Intermediária
H/B/HB	-	Intermediária
-	H/B/HB	Intermediária
H/B	HB	Intermediária
HB	H/B	Intermediária
-	NT	Não Tipável (não definida)

RTD - "Routine Test Dilution"

B - Bacteriófagos pertencentes exclusivamente ao Conjunto Básico Internacional Bovino.

H - Bacteriófagos pertencentes exclusivamente ao Conjunto Básico Internacional Humano.

HB - Fagos comuns a ambos os conjuntos humano e bovino.

NT - Não Tipável

Int.- Intermediária

6.3 Considerando-se as provas de coagulase, fibrinolisina e de fagotipagem.

Procurou-se, então, estabelecer a origem provável das cepas de *S. aureus*, isoladas do leite, através da fagotipagem e das provas de coagulase em plasmas bovino e humano e da fibrinolisina, conforme se observa no quadro 6. Nesse quadro constam as combinações possíveis, indicativas da origem provável das cepas, de acordo com a prova de fagotipagem e provas bioquímicas, relacionando-se, para cada caso, a origem mais provável da cepa, frente aos resultados dessas provas.

QUADRO 6 - CRITÉRIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ORIGEM MAIS PROVÁVEL DAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS, SEGUNDO OS RESULTADOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS DE FIBRINOLISINA, COAGULASE EM PLASMAS HUMANO E BOVINO E DE FAGOTIPAGEM.

ORIGEM PROVÁVEL DAS CEPAS QUANTO ÀS PROVAS		
FAGOTIPAGEM	BIOQUÍMICAS	ORIGEM MAIS PROVÁVEL
Bovina	Bovina	Bovina
Bovina	Intermediária bovina	Bovina
Intermediária bovina	Bovina	Bovina
Humana ou Bovina	Bovina	Bovina
Não tipável	Bovina	Bovina
Humana	Humana	Humana
Humana	Intermediária humana	Humana
Intermediária humana	Humana	Humana
Humana ou bovina	Humana	Humana
Não tipável	Humana	Humana
Bovina	Intermediária	Intermediária bovina
Intermediária bovina	Intermediária bovina	Intermediária bovina
Intermediária bovina	Intermediária	Intermediária bovina
Intermediária	Bovina	Intermediária bovina
Intermediária	Intermediária bovina	Intermediária bovina
Humana ou bovina	Intermediária bovina	Intermediária bovina
Não tipável	Intermediária bovina	Intermediária bovina
Humana	Intermediária	Intermediária humana
Intermediária humana	Intermediária humana	Intermediária humana
Intermediária humana	Intermediária	Intermediária humana
Intermediária	Humana	Intermediária humana
Intermediária	Intermediária humana	Intermediária humana
Humana ou bovina	Intermediária humana	Intermediária humana
Não tipável	Intermediária humana	Intermediária humana
Bovina	Humana	Intermediária
Bovina	Intermediária humana	Intermediária
Humana	Bovina	Intermediária
Humana	Intermediária bovina	Intermediária
Intermediária bovina	Humana	Intermediária
Intermediária bovina	Intermediária humana	Intermediária
Intermediária humana	Bovina	Intermediária
Intermediária humana	Intermediária bovina	Intermediária
Intermediária	Intermediária	Intermediária
Humana ou bovina	Intermediária	Intermediária
Não tipável	Intermediária	Intermediária

7. Verificação da produção de enterotoxina a partir das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas.

7.1 Enterotoxinas e anti-enterotoxinas estafilocócicas padrões.

As enterotoxinas e respectivas anti-enterotoxinas padrões A, B, C, D e E utilizadas, foram preparadas no "Food Research Institute of Wisconsin University", Estados Unidos e gentilmente fornecidas pelo Prof. Merlin S. Bergdoll. Estes produtos biológicos foram enviados na forma liofilizada, sendo para a sua utilização reconstituídos de acordo com as recomendações do Prof. Bergdoll, que acompanhavam tais reagentes. Após a reconstituição, foram distribuídos em tubos de 12 x 120 mm, em volumes de 0,5 ml e mantidos à temperatura de -20°C.

Tais reagentes foram testados, através de provas de dupla imunodifusão em gel de ágar em lâminas, a fim de se estabelecerem as diluições finais a serem utilizadas nos experimentos. A seguir, a partir da diluição inicial, tanto as enterotoxinas quanto os anti-soros foram novamente diluídos com solução salina fosfatada 0,02 M pH 7,3, adicionando-se, em seguida, timerosal na proporção de 1:10.000, de acordo com as instruções enviadas pelo Prof. Bergdoll.

O quadro 7, mostra as especificações dos reagentes e as respectivas diluições utilizadas na verificação da enterotoxigenicidade das cepas de *S. aureus* isoladas.

QUADRO 7 - ENTEROTOXINAS E ANTI-ENTEROTOXINAS PADRÕES E RESPECTIVAS DILUIÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.

Reagente	Tipo	Código	Diluição Utilizada	
enterotoxinas	A	AT-11	1:100	(0,5 µg/ml)
	B	492B-S-6	1:200	(0,5 µg/ml)
	C	585B-137	1:400	(0,25 µg/ml)
	D	DT-13	1:200	(0,25 µg/ml)
	E	ET-10	1:80	(0,25 µg/ml)
anti-enterotoxinas	A	AS-13	1:60	
	B	BS-11	1:140	
	C	C ₁ HP773	1:240	
	D	DS-11	1:96	
	E	ES-12	1:240	

7.2 Produção de enterotoxina pelas cepas de *Staphylococcus aureus* (DONNELLY e cols⁵², 1967 - SIMKOVICOVA & GILBERT¹³⁸, 1971).

Usando-se um quadrado de papel celofane com cerca de 30 cm de lado, preparava-se um saco o qual era introduzido, com o auxílio de um bastão de vidro, no interior de um Erlenmeyer de 300 ml. No interior do saco de celofane, com o auxílio de um funil de vidro, eram colocados 50 ml de caldo infusão de cérebro e coração em concentração dupla. A extremidade superior do saco de celofane era amarrada com um barbante e presa ao gargalo do frasco, mantendo-se a sua base no fundo do frasco, sendo este, a seguir, tampado com rolha de algodão. O frasco, assim preparado, era esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Para a obtenção dos extratos utilizados na pesquisa de enterotoxina, cada cepa de *S. aureus* era semeada em 2 tubos de ágar infusão cérebro e coração, seguida de incubação a 37°C por 24 horas. Após este período, o crescimento bacteriano de cada tubo era suspenso em 1 ml de solução salina fosfatada 0,02 M pH 7,3 e os 2 ml de suspensão eram colocados, assepticamente, no interior do Erlenmeyer ao redor do saco de celofane. Adicionavam-se, a seguir, 8 ml de solução salina fosfatada pH 7,3 no fundo do frasco, aumentando-se, assim, o volume da suspensão para 10 ml, sendo o conjunto incubado a 37°C por 48 horas. Após a incubação, a suspensão era transferida para um tubo de centrífuga esterilizado de 15 ml, procedendo-se, a seguir, a centrifugação por 45 minutos a 4.200 r.p.m. em centrífuga refrigerada. O sobrenadante, que constituía o extrato, era transferido para um tubo de 12 x 120 mm, adicionado de timerosal na proporção de 1:5.000 e mantido a -20°C até o momento de serem submetidos à pesquisa de enterotoxina.

Paralelamente, era obtidos, também, extratos preparados a partir de cepas sabidamente produtoras de enterotoxinas A, B, C, D e E representadas, respectivamente, pelos códigos: ITAL-STH 009, ITAL-STH 010, (do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas), FRI-137, FRI-427 e FRI-326 (do Food Research Institute, Wisconsin University, E.U.A.).

7.3 Pesquisa de enterotoxina estafilocócica

Para se verificar a presença de enterotoxina nos extratos obtidos foram seguidas as instruções enviadas, juntamente com as toxinas e anti-enterotoxinas padrões, pelo

Prof. Bergdoll e a técnica de dupla imunodifusão empregada por VILLARROEL¹⁵¹ (1972).

Para essa pesquisa eram utilizadas lâminas de microscopia, medindo 26 x 76 mm e com 1 mm de espessura, as quais eram previamente limpas através de imersão em água com detergente e enxaguadura em água corrente e, posteriormente, em água destilada. Após a secagem, uma das faces das lâminas era coberta com 1 ml de ágar a 1% fundido, sendo as mesmas, a seguir mantidas em estufa a 37°C para a secagem do ágar. Após a secagem, as lâminas eram mantidas en voltas, separadamente, em papel de filtro até o momento do uso, quando recebiam uma segunda camada de 3 ml de ágar a 1% em solução fisiológica contendo timerosal a 1:10.000. Após a solidificação do ágar, eram feitas cinco perfurações, sen do uma central e quatro periféricas, usando-se um cilindro metálico, com extremidade de borda cortante e ligado a uma bomba de vácuo. Para isto, usando-se uma matriz desenhada em papel milimetrado, aspiravam-se os cinco cilindros de ágar seguindo-se a orientação da matriz. Desta forma, em cada lâmina, faziam-se três conjuntos de cinco orifícios. Cada orifício tinha 4 mm de diâmetro e a distância centro a centro, entre o orifício central e os periféricos, era de 7 mm. Para cada extrato, eram utilizadas 2 lâminas, totalizando cinco conjuntos de cinco orifícios, sendo cada conjunto cor respondente a um tipo de enterotoxina.

Na pesquisa de enterotoxina, usando-se uma pi peta Pasteur para cada reagente, os cinco orifícios centrais eram preenchidos com cerca de 0,02 ml, respectivamente, com as soluções padrões de anti-enterotoxina estafilocócica A, B, C, D e E. Nos orifícios superior direito e inferior es-

querdo do primeiro conjunto colocava-se a solução padrão de enterotoxina A e, da mesma forma, nos conjuntos subseqüentes as enterotoxinas padrões B, C, D e E. Os orifícios superior esquerdo e inferior direito dos cinco conjuntos eram preenchidos com o extrato, no qual estava-se pesquisando a presença de enterotoxina. Em seguida, as lâminas eram colocadas em cubas de vidro contendo chumaços de algodão embebidos em água, a fim de se evitar a desidratação do ágar e mantidas durante 24 horas a 37°C.

A primeira leitura era feita com o auxílio da iluminação com lâmpada fluorescente em fundo escuro. A seguir, utilizando-se a técnica empregada por VILLARROEL¹⁵¹ (1972) as lâminas eram submetidas a um processo de coloração. Para isto, eram mergulhadas em cubas de vidro contendo solução de cloreto de sódio a 0,85%, renovada três vezes por dia, durante 2 dias. A seguir, as lâminas eram envolvidas em papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas em estufa a 60°C até a secagem do papel. Esta operação era repetida uma vez, após o que as lâminas eram lavadas em água corrente e secas em estufa a 60°C. Para a coloração da preparação, as lâminas eram colocadas em cubas contendo solução de Amido Schwarz 10B a 0,4% em ácido acético, onde permaneciam por 10 minutos. Em seguida, eram descoradas com solução de ácido acético a 5%, lavadas em água corrente e, posteriormente, mantidas em posição inclinada sobre uma folha de papel de filtro, a fim de serem secas. Após a secagem realizava-se a segunda leitura, também com o auxílio de uma lâmpada de luz fluorescente e fundo branco, e isto permitia a elucidação de reações duvidosas constatadas na primeira leitura.

Considerava-se a reação positiva para determinado tipo de enterotoxina, quando se verificava a presença de uma linha contínua de precipitação ao redor do orifício central. A prova era acompanhada de reações paralelas, realizadas com extratos controles obtidos a partir de cepas de **Staphylococcus aureus** sabidamente produtoras dos cinco tipos de enterotoxinas, respectivamente.

RESULTADOS

Apresentam-se, a seguir, os resultados das contagens de *Staphylococcus aureus* a partir das 100 amostras de leite analisadas, bem como, das provas bioquímicas, de fagotipagem e de produção de enterotoxina, procedidos com as cepas isoladas.

Na tabela 1 encontra-se a distribuição das amostras de leite das cinco linhas existentes em Pirassununga, segundo a positividade para *S. aureus*. Das 100 amostras pesquisadas, 50 (50,0%) mostraram-se positivas para *S. aureus*, sendo 3 (25,0%) da linha a, 1 (50,0%) da linha b, 12 (57,1%) da linha c, 15 (48,4%) da linha d e 19 (55,9%) da linha e.

Na tabela 2 estão distribuídas as 53 propriedades das cinco linhas, das quais foram obtidas as amostras de leite, segundo a positividade para *S. aureus*. Destas, 36 (67,9%) revelaram-se com amostras de leite positivas para *S. aureus*, sendo 1 (100,0%) na linha a; 1 (100,0%) na linha b; 12 (60,0%) na linha c; 11 (64,7%) na linha d e 11 (78,6%) na linha e.

A tabela 3 mostra a distribuição das 50 amostras positivas, segundo o número de *S. aureus* por mililitro de leite. Nas 50 amostras de leite positivas para *S. aureus*, os números obtidos na contagem dessa bactéria variaram de 30 a 19.500/ml na linha a, de 340 a 110.000/ml na linha c, de 200 a 67.500/ml na linha d, de 50 a 93.000/ml na linha e, sendo de 455/ml na amostra da linha b.

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE SEGUNDO AS SUAS LINHAS DE ORIGEM E A POSITIVIDADE PARA *S. aureus* (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

<div> <div>Linha de leite</div> <div>Amostras de leite</div> <div>Isolamento de <i>S. aureus</i></div> </div>	a		b		c		d		e		TOTAL	
	Nº		Nº		Nº		Nº		Nº		Nº	
	%		%		%		%		%		%	
Positivo	3	25,0	1	50,0	12	57,1	15	48,4	19	55,9	50	50,0
Negativo	9	75,0	1	50,0	9	42,9	16	51,6	15	44,1	50	50,0
TOTAL	12	100,0	2	100,0	21	100,0	31	100,0	34	100,0	100	100,0

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO DAS PROPRIEDADES LEITEIRAS SEGUNDO A POSITIVIDADE PARA *S. aureus*, EM AMOSTRAS DE LEITE EXAMINADAS OBTIDAS DAS DIFERENTES LINHAS (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

<div> <div>Linha de leite</div> <div>Propriedades</div> <div>Isolamento de <i>S. aureus</i></div> </div>	a		b		c		d		e		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	1	100,0	1	100,0	12	60,0	11	64,7	11	78,6	36	67,9
Negativo	0	0	0	0	8	40,0	6	35,3	3	21,4	17	32,1
TOTAL	1	100,0	1	100,0	20	100,0	17	100,0	14	100,0	53	100,0

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO DAS 50 AMOSTRAS DE LEITE POSITIVAS PARA *S. aureus* SEGUNDO O NÚMERO DESSA BACTÉRIA POR MILILITRO E AS RESPECTIVAS LINHAS DE LEITE (PI RASSUNUNGA, SP, 1981).

Linha de leite	Amostras positivas para <i>S. aureus</i>	
	Nº	número/ml
a	1	30
	1	120
	1	19.500
b	1	455
c	1	340
	1	860
	1	1.550
	1	1.950
	1	3.450
	1	3.950
	1	8.000
	1	13.050
	1	31.500
	1	34.000
	1	64.000
	1	110.000
d	1	200
	1	500
	1	815
	1	1.000
	1	1.235
	1	4.050
	1	4.550
	1	4.900
	1	6.550

TABELA 3
(continuação)

d	1	16.000
	1	19.000
	1	19.500
	1	37.500
	1	56.500
	1	67.500
e	1	50
	1	100
	1	120
	1	150
	1	295
	1	350
	1	400
	1	660
	1	690
	2	1.240
	1	1.500
	1	2.150
	1	2.250
	1	9.750
	1	12.000
	1	19.500
	1	64.000
	1	93.000

Na tabela 4 estão distribuídas as amostras de leite, segundo o número de *S. aureus* por mililitro e a positividade para cepas produtoras de enterotoxina estafilocócica. Das 100 amostras de leite examinadas, 50 (50,0%) apresentaram contagens de *S. aureus* que variaram entre 5 a 5×10 e 10^5 e mais, distribuídas em 7 classes. De uma amostra foi isolada uma cepa produtora de enterotoxina do tipo B (1,0%), a qual está incluída entre as que se revelaram com 10^2 a 10^3 exclusive de *S. aureus* por ml de leite.

Na primeira classe, são incluídas as amostras com 0 a 5 *S. aureus*/ml exclusive e que foram consideradas negativas. Pelo processo de contagem utilizado, teoricamente, só se poderia obter crescimento de colônias de *S. aureus* nas placas da primeira diluição usada, quando o seu número fosse igual ou superior a 5/ml de leite. Assim sendo, o resultado para as 50 amostras incluídas nessa classe deveria ser relatado como menor que 5 *S. aureus*/ml de leite, porém, elas foram por nós consideradas como sendo negativas para essa bactéria.

Na tabela 5 estão distribuídas as 201 cepas de *S. aureus*, de acordo com os resultados obtidos quanto ao seu comportamento frente às provas bioquímicas de identificação e também com relação a outros testes adicionais com a finalidade de se constatar outras características.

Na tabela 6 as 201 cepas de *S. aureus* estudadas estão distribuídas em oito grupos de combinações, segundo os resultados das provas bioquímicas da fibrinolisinase e da coagulase com plasmas humano e bovino.

Nas tabelas 7 e 8 encontram-se distribuídas

TABELA 4

DISTRIBUIÇÃO DAS 100 AMOSTRAS DE LEITE SEGUNDO O NÚMERO DE *S. aureus* POR MILILITRO DE LEITE E A POSITIVIDADE PARA CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

S. aureus por mililitro	Amostras de leite				
			com cepas de S. aureus produtoras de enterotoxina		
	Nº	%	Nº	%	tipo
0 ————— 5	50	50	-	-	-
5 ————— 5 x 10	1	1,0	-	-	-
5 x 10 ————— 10 ²	1	1,0	-	-	-
10 ² ————— 10 ³	15	15,0	1	1,0	B
10 ³ ————— 10 ⁴	17	17,0	-	-	-
10 ⁴ ————— 10 ⁵	15	15,0	-	-	-
10 ⁵ e mais	1	1,0	-	-	-
TOTAL	100	100,0	1	1,0	

TABELA 5

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE LEITE EXAMINADAS, SEGUNDO A POSITIVIDADE PARA AS DIFERENTES PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

PROVAS BIOQUÍMICAS	CEPAS DE <i>S. aureus</i>	
	Nº	%
Catalase	201	100,0
Glicose O/F	201	100,0
Coagulase(plasma de coelho)	201	100,0
Termonuclease	189	94,0
Pigmento amarelo	198	98,5
Pigmento branco	3	1,5
Acetoína	175	87,1
Maltose(aerobiose)	196	97,5
Manitol(aerobiose e anaerobiose)	189	94,0
Manitol(anaerobiose)	3	1,5
Cristal violeta(col.amarela)	142	70,6
Cristal violeta(col.violeta)	56	27,9
Cristal violeta(col.branca)	3	1,5
Fibrinolisisina	125	62,2
Coagulase(plasma humano)	183	91,0
Coagulase(plasma bovino)	87	43,3

col. - colônia

TABELA 6

DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS DE *S. aureus* SEGUNDO O SEU COMPORTAMENTO FRENTE ÀS PROVAS DE FIBRINOLISINA E DA COAGULASE COM PLASMAS HUMANO E BOVINO (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

PROVAS BIOQUÍMICAS	CEPAS DE <i>S. aureus</i>	
	Nº	%
Fibrinolisinina + Coagulase(plasma humano) + Coagulase(plasma bovino) -	64	31,8
Fibrinolisinina - Coagulase(plasma humano) + Coagulase(plasma bovino) +	28	13,9
Fibrinolisinina - Coagulase(plasma humano) + Coagulase(plasma bovino) -	37	18,4
Fibrinolisinina + Coagulase(plasma humano) + Coagulase(plasma bovino) +	54	26,9
Fibrinolisinina + Coagulase(plasma humano) - Coagulase(plasma bovino) +	1	0,5
Fibrinolisinina + Coagulase(plasma humano) - Coagulase(plasma bovino) -	6	3,0
Fibrinolisinina - Coagulase(plasma humano) - Coagulase(plasma bovino) -	7	3,5
Fibrinolisinina - Coagulase(plasma humano) - Coagulase(plasma bovino) +	4	2,0
TOTAL	201	100,0

+ prova positiva ; - prova negativa

as 201 cepas de **S. aureus** estudadas, segundo os resultados obtidos nas provas de fagotipagem realizadas com os fagos dos Conjuntos Básicos Internacionais para cepas de origem humana e bovina, respectivamente, agrupadas de acordo com os fagótipos a que pertencem.

Nas tabelas 9 e 10 estão distribuídas as 201 cepas de **S. aureus**, segundo os resultados obtidos nas provas de fagotipagem frente aos fagos dos Conjuntos Básicos Internacionais para cepas de origem humana e bovina, respectivamente, e sua relação com as 50 amostras positivas para essa bactéria e com as 36 propriedades de cujos latões foram colhidas tais amostras.

Nas tabelas 11 e 12 encontram-se as 201 cepas de **S. aureus** estudadas, distribuídas em quatro grupos de resultados, segundo a sensibilidade a 1 x RTD e 100 x RTD, aos fagos dos Conjuntos Básicos Internacionais Humano e Bovino, respectivamente.

A tabela 13 mostra as 201 cepas de **S. aureus** distribuídas, segundo a sensibilidade a fagos dos Conjuntos Básicos Internacionais Humano e Bovino, isoladamente ou em associação, levando-se em conta as 2 diluições utilizadas, ou seja, a 1 x RTD e a 100 x RTD.

Na tabela 14, as 201 cepas de **S. aureus** estão distribuídas segundo a sua origem provável, com base nos resultados das provas de fibrinolisisina, coagulase em plasmas humano e bovino e de acordo com os critérios mostrados nos quadros 4, 5 e 6.

Na tabela 15 as 201 cepas de **S. aureus** estão distribuídas, segundo a sua origem provável, humana e bovii

na e a coloração de colônias desenvolvidas em ágar cristal violeta.

TABELA 7

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus*, ISOLADAS DAS 50 AMOSTRAS DE LEITE POSITIVAS PARA ESSA BACTÉRIA, SEGUNDO A FAGOTIPAGEM REALIZADA COM O CONJUNTO BÁSICO PARA CEPAS DE ORIGEM HUMANA (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

Fagotipagem		CEPAS DE <i>S. aureus</i>		TOTAL	
GRUPOS	TIPOS	Nº	%		
I	52	1	0,5		
I	79	1	0,5		
I	29/52/80	1	0,5		
I	29/52/52A	2	1,0		
II	3A	1	0,5		
II	55	1	0,5		
II	3A/3C/71	1	0,5		
II	3A/3C/55/71	2	1,0		
II	3A/55	1	0,5		
III	42E	9	4,5		
III	47	1	0,5		
III	53	2	1,0		
III	75	1	0,5		
III	77	2	1,0		
III	83A	2	1,0		
III	84	1	0,5		
III	85	2	1,0		
III	6/42E	10	5,0		
III	77/83A	1	0,5		
III	53/83A	7	3,5		
III	42E/47	1	0,5		
III	53/85	1	0,5		

TABELA 7
(continuação)

III	83A/85	2	1,0
III	77/85	1	0,5
III	77/84	1	0,5
III	42E/47/84	2	1,0
III	6/47/85	1	0,5
III	6/42E/47	4	2,0
III	47/53/84	1	0,5
III	47/53/83A	1	0,5
III	53/54/83A	1	0,5
III	53/83A/85	2	1,0
III	47/53/85	1	0,5
III	42E/53/83A	1	0,5
III	54/77/83A	1	0,5
III	6/42E/53/83A	1	0,5
III	42E/53/83A/85	1	0,5
III	42E/47/53/83A/85	1	0,5
III	42E/47/77/83A/85	1	0,5
III	6/42E/47/53/77	1	0,5
III	6/42E/47/53/77/83A	1	0,5
III	6/42E/54/77/83A/85	1	0,5
III	42E/47/54/75/77/83A/84	1	0,5
III	6/42E/47/75/77/83A/85	1	0,5
NC	96	1	0,5
I/III	29/85	2	1,0
I/III	29/53/84	1	0,5
I/III	29/52/52A/47	1	0,5
I/III	29/52/42E/47	1	0,5
I/III	79/80/42E/47/53/75	1	0,5
II/III	3A/42E	1	0,5
II/III	3A/77	1	0,5
II/III	3A/3C/77	1	0,5
II/III	3A/42E/77/83A	1	0,5
II/III	3A/6/42E/77	1	0,5
II/III	3A/42E/54/77	1	0,5
II/III	3A/6/42E	1	0,5
II/III	3A/6/42E/47/77/83A	1	0,5
II/III	3A/6/42E/47/53/77/83A	1	0,5

TABELA 7

(continuação)

II/III	3A/6/42E/47/53/54/77/83A/85	1	0,5
I/NC	29/52/80/81	3	1,5
I/NC	29/52/52A/80/81	6	3,0
III/NC	81/42E	3	1,5
III/NC	81/84	1	0,5
III/NC	81/6/42E	1	0,5
III/NC	81/42E/54	2	1,0
III/NC	81/42E/53	1	0,5
III/NC	81/42E/47	6	3,0
III/NC	81/6/42E/47	6	3,0
III/NC	81/42E/47/53	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/54	1	0,5
III/NC	81/6/42E/77/83A	1	0,5
III/NC	42E/47/54/77/94	1	0,5
III/NC	6/47/54/77/94	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/77/83A	1	0,5
III/NC	6/42E/47/53/84/94	1	0,5
III/NC	6/47/53/54/77/84/94	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/54/75/77	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/53/54/75/77/84/94	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/53/54/75/77/83A/85	1	0,5
III/NC	81/6/42E/47/53/54/75/77/83A/85/95	1	0,5
I/III/NC	52A/81/42E	1	0,5
I/III/NC	52A/83A/95	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/81/6/42E/47	1	0,5
I/III/NC	79/81/6/42E/47/54/77	1	0,5
I/III/NC	81/6/42E/47/53/54/79/84/94	1	0,5
I/III/NC	52/6/42E/47/53/77/83A/84/85/94	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/47/53/77/83A/84/85/95	1	0,5
I/III/NC	52A/79/81/6/42E/47/53/54/83A/96	1	0,5
I/III/NC	29/79/81/6/42E/47/54/75/77	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/81/6/42E/47/53/54/75/77/83A	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/79/6/42E/47/53/54/75/83A/85/95/	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/79/80/81/6/42E/47/53/54/75/ 83A/85/95	2	1,0
I/III/NC	29/52/52A/79/80/81/6/42E/47/53/54/75/77/ 83A/95	1	0,5

TABELA 7
(continuação)

I/III/NC	29/52/52A/79/80/81/42E/47/53/54/75/77/ 83A/84/85/94/95	1	0,5
I/III/NC	29/52/52A/79/80/81/6/42E/47/53/54/75/ 77/83A/85/95	1	0,5
II/III/NC	3A/3C/81/6/42E/47	3	1,5
II/III/NC	3A/3C/81/6/42E	1	0,5
II/III/NC	3A/81/6/42E/53/54/77/84	1	0,5
II/III/NC	3A/81/6/42E/53/54/77/83A	1	0,5
II/III/NC	3A/81/6/42E/47/53/77/83A	1	0,5
II/III/NC	71/81/42E/47/75/83A	1	0,5
II/III/NC	3A/3C/81/6/42E/47/53/54/77/83A	1	0,5
I/II/III/NC	52/3A/3C/81/6/42E/47/53/54/77/83A/	1	0,5
I/II/III/NC	52/3A/3C/81/6/42E/47/53/54/77/83A/95	1	0,5
I/II/III/NC	52/3C/81/42E/47/77/83A/94	1	0,5
I/II/III/NC	29/52/52A/79/80/3A/3C/55/71/81/6/42E/ 47/53/54/75/77/83A/84/85/94/95/96	1	0,5
NT		35	17,4

NC - Não classificado

NT - Não tipável

TABELA 8

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DAS 50 AMOSTRAS DE LEITE POSITIVAS PARA ESSA BACTÉRIA, SEGUNDO A FAGOTIPAGEM REALIZADA COM O CONJUNTO BÁSICO PARA CEPAS DE ORIGEM BOVINA (PIRAS-SUNUNGA, SP, 1981)..

Fagotipagem \ Cepas de <i>S. aureus</i>		TOTAL	
Grupos	Tipos	Nº	%
I	29	5	2,5
I	52A	1	0,5
I	29/52A	7	3,5
II	3A	2	1,0
II	116	1	0,5
III	75	1	0,5
III	6	1	0,5
III	42E	4	2,0
III	53	13	6,5
III	6/42E	9	4,5
III	42E/84	1	0,5
III	42E/53	1	0,5
III	6/53/84	1	0,5
III	6/42E/53	1	0,5
III	42E/75/84	1	0,5
III	6/42E/53/84	1	0,5
IV	42D	3	1,5
IV	107	3	1,5
IV	117	4	2,0
IV	102/107	5	2,5
IV	102/117	3	1,5
IV	107/117	3	1,5
IV	42D/117	1	0,5
IV	102/107/117	12	6,0
IV	42D/102/107/117	1	0,5
M	119	3	1,5
M	118	1	0,5
M	118/119	1	0,5
M	78/118/119	1	0,5
I/III	29/53/84	1	0,5

TABELA 8
(continuação)

I/III	29/52A/53/84	1	0,5
I/III	29/52A/6/42E/53/75	2	1,0
I/IV	29/102	1	0,5
I/M	29/52A/118	1	0,5
I/M	29/52A/78/118	1	0,5
II/III	3A/42E	1	0,5
II/III	3A/6/42E	2	1,0
II/III	3A/6/42E/53	2	1,0
II/IV	116/107	1	0,5
II/IV	116/102	1	0,5
II/IV	3A/117	1	0,5
II/IV	116/107/117	1	0,5
II/M	116/78	1	0,5
II/M	3A/118	1	0,5
III/IV	42E/42D	1	0,5
III/IV	42E/102	1	0,5
III/IV	42E/102/107	1	0,5
III/IV	6/42E/53/117	1	0,5
III/IV	6/42E/102/107	3	1,5
III/IV	42E/102/107/117	2	1,0
III/IV	42E/107/117	1	0,5
III/IV	84/102/107	1	0,5
III/IV	42E/102/107/117/42D	2	1,0
III/IV	6/42E/102/107/117	5	2,5
III/IV	42E/53/102/107/117	3	1,5
III/IV	42E/75/102/107/117	1	0,5
III/IV	6/42E/102/107/117/42D	2	1,0
III/IV	6/42E/75/102/107/117/42D	1	0,5
III/M	53/118	2	1,0
III/M	84/78/118	1	0,5
III/M	42E/118/119	1	0,5
III/M	6/42E/53/118	1	0,5
IV/M	117/119	1	0,5
IV/M	117/118	1	0,5

TABELA 8
(continuação)

IV/M	107/118	2	1,0
IV/M	117/78/119	1	0,5
IV/M	107/117/119	1	0,5
IV/M	78/102/107/117	1	0,5
I/III/IV	29/42E/102/107/117	1	0,5
I/III/IV	29/52A/6/42E/53/75/117	1	0,5
I/III/IV	29/52A/6/42E/53/75/102/107/117	2	1,0
I/III/M	3A/42E/118	1	0,5
I/III/M	52A/42E/118	1	0,5
I/III/M	52A/6/42E/53/118	1	0,5
II/III/IV	3A/42E/42D	1	0,5
II/III/IV	3A/6/42E/102	1	0,5
II/III/IV	3A/6/42E/53/42D	3	1,5
II/III/IV	3A/6/42E/53/102	1	0,5
II/III/IV	42E/102/107/116/117/42D	1	0,5
II/IV/M	116/42D/118	1	0,5
II/IV/M	116/78/102	1	0,5
II/IV/M	116/102/107/118	1	0,5
II/IV/M	116/42D/117/78	1	0,5
II/IV/M	116/117/78/118/119	1	0,5
II/IV/M	3A/102/107/117/78/118	1	0,5
III/IV/M	6/102/118	1	0,5
III/IV/M	42E/42D/107/117/118	1	0,5
III/IV/M	42E/53/75/117/119	1	0,5
III/IV/M	84/107/118	1	0,5
III/IV/M	6/42E/53/84/107/78/119	1	0,5
III/IV/M	6/42E/53/84/117/78/118	1	0,5
II/III/M	3A/6/42E/53/84/78	1	0,5
II/III/M	3A/6/42E/53/118	1	0,5
II/III/M	116/42E/53/78/119	1	0,5
I/III/IV/M	29/52A/6/42E/53/75/102/107/118	1	0,5
I/III/IV/M	29/52A/6/42E/102/107/117/118	1	0,5
I/II/III/IV/M	29/52A/3A/116/6/42E/53/75/84/ 42D/102/107/117/78/118/119	1	0,5
NT		23	11,4

M - Miscelânea
NT - Não tipável

TABELA 9

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A FAGOTIPAGEM COM O CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL HUMANO E SUA RELAÇÃO COM AS 50 AMOSTRAS POSITIVAS PARA ESSA BACTÉRIA, OBTIDAS DE 36 PROPRIEDADES LEITEIRAS (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

S.aureus correspondente aos Grupos de fagos	Cepas de S.aureus *		Amostras de leite**		Propriedades leiteiras***	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	5	2,5	5	10,0	5	13,9
II	6	3,0	2	4,0	2	5,6
III	68	33,8	31	62,0	26	72,2
NC	1	0,5	1	2,0	1	2,8
I/III	6	3,0	3	6,0	3	8,3
II/III	10	5,0	6	12,0	6	16,7
I/NC	9	4,5	4	8,0	4	11,1
III/NC	32	15,9	22	44,0	20	55,6
I/III/NC	16	8,0	11	22,0	9	25,0
II/III/NC	9	4,5	6	12,0	6	16,7
I/II/III/NC	4	2,0	4	8,0	4	11,1
Não Tipável	35	17,4	19	38,0	16	44,4

NC - Não Classificado

* - para 201 cepas

** - para 50 amostras positivas

*** - para 36 propriedades leiteiras com amostras positivas.

TABELA 10

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A FAGOTIPAGEM COM O CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL BOVINO E SUA RELAÇÃO COM AS 50 AMOSTRAS POSITIVAS PARA ESSA BACTÉRIA, OBTIDAS DE 36 PROPRIEDADES LEITEIRAS (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

S.aureus correspondentes aos Grupos de fagos	Cepas de S.aureus*		Amostras de leite**		Propriedades leiteiras***	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	13	6,5	6	12,0	6	16,7
II	3	1,5	3	6,0	2	5,6
III	34	16,9	18	36,0	17	47,2
IV	35	17,4	14	28,0	13	36,1
M	6	3,0	6	12,0	5	13,9
I/III	4	2,0	3	6,0	3	8,3
I/IV	1	0,5	1	2,0	1	2,8
I/M	2	1,0	1	2,0	1	2,8
II/III	5	2,5	4	8,0	4	11,1
II/IV	4	2,0	4	8,0	4	11,1
II/M	2	1,0	2	4,0	1	2,8
III/IV	25	12,4	15	30,0	14	38,9
III/M	5	2,5	5	10,0	5	13,9
IV/M	7	3,5	6	12,0	6	16,7
I/III/IV	4	2,0	2	4,0	2	5,6
I/III/M	3	1,5	3	6,0	3	8,3
II/III/IV	7	3,5	6	12,0	6	16,7
II/IV/M	6	3,0	6	12,0	5	13,9
III/IV/M	6	3,0	6	12,0	6	16,7
II/III/M	3	1,5	3	6,0	3	8,3
I/III/IV/M	2	1,0	2	4,0	2	5,6
I/II/III/IV/M	1	0,5	1	2,0	1	2,8
Não Tipável	23	11,4	13	26,0	12	33,3

M - Miscelânea

* - para 201 cepas

** - para 50 amostras positivas

*** - para 36 propriedades leiteiras com amostras positivas.

TABELA 11

DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A SUA SENSIBILIDADE AOS FAGOS DO CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL HUMANO (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

Diluição dos fagos Cepas de <i>S. aureus</i> Sensibili- dade a fagos	1 X RTD		100 X RTD		TOTAL	
	Nº	% *	Nº	%*	Nº	%*
Exclusivamente humano (H)	13	6,5	3	1,5	16	8,0
Comuns ao Con- junto Humano e Bovino (HB)	19	9,4	8	4,0	27	13,4
Exclusivamente humano e comuns aos conjuntos humano e bovino (H/HB)	81	40,3	42	20,9	123	61,2
Não Tipáveis	-	-	35	17,4	35	17,4
TOTAL	113	56,2	88	43,8	201	100,0

RTD - "Routine Test Dilution"

* Percentagem em relação às 201 cepas.

TABELA 12
DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A SUA SENSIBILIDADE AOS FAGOS DO CONJUNTO BÁSICO INTERNACIONAL BOVINO A 1 x RTD E A 100 x RTD (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg); text-align: center;"> Diluição dos fagos Cepas de <i>S. aureus</i> Sensibilida- de a fagos </div>	1 X RTD		100 X RTD		TOTAL	
	Nº	%*	Nº	%*	Nº	%*
Exclusivamente do Conjunto Bovino (B)	49	24,4	9	4,5	58	28,9
Comuns aos Conjuntos Humano e Bovino (HB)	49	24,4	9	4,5	58	28,9
Exclusivamente Bovino e comuns aos Conjuntos Humano e Bovino (B/HB)	51	25,3	11	5,5	62	30,8
Não Tipáveis	-	-	23	11,4	23	11,4
TOTAL	149	74,1	52	25,9	201	100,0

RTD - "Routine Test Dilution".

* Percentagem em relação às 201 cepas.

TABELA 13

DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A SENSIBILIDADE FRENTE A 1 x RTD e 100 x RTD AOS FAGOS DOS CONJUNTOS BÁSICOS INTERNACIONAIS HUMANO E BOVINO (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

Sensibilidade aos fagos dos Conjuntos Humano e Bovino		Cepas de <i>S. aureus</i>	
1 X RTD	100 X RTD	Nº	%
H	-	3	1,5
-	H	1	0,5
H/HB	-	18	8,9
-	H/HB	6	3,0
Sub-total		28	13,9
B	-	12	6,0
-	B	4	2,0
B	HB	4	2,0
HB	B	7	3,5
B/HB	-	10	5,0
-	B/HB	1	0,5
Sub-total		38	19,0
H	B	4	2,0
H/HB	B	22	10,9
Sub-total		26	12,9
B	H	1	0,5
B	H/HB	26	12,9
Sub-total		27	13,4
H/B	-	6	3,0
-	H/B	1	0,5
H/B/HB	-	41	20,4
-	H/B/HB	10	5,0
Sub-total		58	28,9
HB	-	2	1,0
-	HB	3	1,5
Sub-total		5	2,5
-	Não Tipável	19	9,4
TOTAL		201	100,0

RTD - "Routine Test Dilution".

H - Fagos pertencentes exclusivamente ao Conjunto Básico Internacional Humano.

B - Fagos pertencentes exclusivamente ao Conjunto Básico Internacional Bovino.

HB - Fagos pertencentes a ambos os conjuntos, humano e bovino.

TABELA 14

DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A ORIGEM PROVÁVEL HUMANA OU BOVINA, COM BASE NOS RESULTADOS OBTIDOS NAS PROVAS DE FIBRINOLISINA, COAGULASE EM PLASMAS HUMANO E BOVINO E DE FAGOTI PAGEM (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

CEPAS DE <i>S. aureus</i>		
ORIGEM PROVÁVEL *	Nº	%
Humana	40	19,9
Bovina	21	10,4
Intermediária humana	36	17,9
Intermediária bovina	56	27,9
Intermediária	48	23,9
TOTAL	201	100,0

* De acordo com os critérios estabelecidos nos quadros 4, 5 e 6.

TABELA 15

DISTRIBUIÇÃO DAS 201 CEPAS DE *S. aureus*, SEGUNDO A SUA ORIGEM PROVÁVEL, HUMANA OU BOVINA E A COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS EM ÁGAR CRISTAL VIOLETA (PIRASSUNUNGA, SP, 1981).

Cor das colônias Cepas de <i>S. aureus</i>	Amarela		Violeta		Branca		TOTAL	
Origem provável	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Humana	21	52,5	19	47,5	0	0	40	100,0
Bovina	20	95,2	0	0	1	4,8	21	100,0
Intermediária humana	30	83,3	6	16,7	0	0	36	100,0
Intermediária bovina	39	69,6	16	28,6	1	1,8	56	100,0
Intermediária	32	66,7	15	31,2	1	2,1	48	100,0

DISCUSSÃO

Como já foi salientado, o leite cru pode apresentar-se contaminado por *S. aureus*, cujo número presente poderá ser maior ou menor, dependendo das condições higiênicas de sua obtenção, conservação e de transporte até a usina para o seu beneficiamento.

Verifica-se na tabela 1 que, das 100 amostras de leite examinadas, colhidas das 5 linhas de leite existentes no Município de Pirassununga, SP, 50% apresentaram-se positivas para *S. aureus*, valor que poderia ser maior se tivessem sido empregadas técnicas de enriquecimento, nas quais a quantidade de leite analisada é maior do que a verificada nos processos de contagem. Mesmo assim, a taxa de positividade para essa bactéria, observada nas amostras de leite examinadas, pode ser considerada elevada. Observa-se ainda que das 5 linhas de leite existentes em Pirassununga, a linha a foi a que forneceu amostras desse produto com menor positividade para *S. aureus* (25,0%). Deve-se, entretanto, considerar que tal linha é representada por apenas uma propriedade leiteira de boa qualidade e de alta produção, sendo a obtenção do leite realizada através de ordenha mecânica.

Com relação à linha b, pode-se verificar na mesma tabela que a positividade para *S. aureus* nas amostras analisadas foi elevada, porém, tal resultado deve ser considerado com reservas. Esta linha é, também, representada por apenas uma propriedade com baixa produção leiteira e dela,

apenas 2 amostras de leite foram examinadas, obtidas de 2 latões os quais continham um volume de leite correspondente à sua produção diária. Por outro lado, as linhas c, d e e, cada uma respectivamente com 20, 17 e 14 propriedades que produziram no dia da colheita das amostras, 1332, 1753 e 1906 litros de leite, respectivamente (Quadro 1), obtidos através de ordenha manual, apresentaram positividade para *S. aureus* nas suas amostras examinadas, de 57,1%, 48,4% e 55,9%, respectivamente, valores estes que podem ser, também, considerados altos.

Porém, WILSON¹⁵⁷ (1977) analisando amostras de leite cru obtidas em 2 companhias de leite da região de Paraibuna, S. Paulo, constatou positividade para *S. aureus* de 76,4% e 88,7%, respectivamente, estas portanto, muito mais elevadas do que as observadas no presente estudo.

Analisando-se a tabela 2, observa-se que um número elevado de propriedades leiteiras, ou seja, 36 (67,9%) das 53 que compunham as 5 linhas de Pirassununga, revelaram-se com amostras de leite positivas para *S. aureus*. Porém, levando-se em consideração apenas as linhas c, d e e, pois as linhas a e b eram representadas por apenas 1 propriedade leiteira cada uma, verifica-se que 12 (60,0%), 11 (64,7%) e 11 (78,6%) propriedades, respectivamente, forneceram amostras de leite positivas para *S. aureus*, revelando-se portanto um número elevado de propriedades em que esse produto apresentava-se contaminado por essa bactéria. Estes fatos demonstram que a contaminação do leite, por cepas de *S. aureus* provenientes de animais, de pessoas que manipulam o produto, de utensílios utilizados, ou ainda do próprio ambiente, é elevada. Isto sugere que as medidas higiênico-sa

nitários devem ser aplicadas com mais rigor, a fim de se evitar um elevado grau de contaminação por *S. aureus* e sua multiplicação, para que se possa obter um produto de melhor qualidade.

Analisando-se a tabela 3, pode-se verificar que o número de *S. aureus* por mililitro de leite nas 50 amostras positivas, variou de 30 a 110.000, valores estes relativamente baixos, quando comparados com os obtidos por WILSON¹⁵⁷ (1977) em S. Paulo. Este autor, ao pesquisar o grau de contaminação por *S. aureus* em várias linhas de leite da região de Paraibuna, SP, observou que das 291 e 195 amostras de leite cru, colhidas em duas usinas, 258 e 149 apresentavam contagens médias dessa bactéria, de 1.878.000 e 780.000 por ml, respectivamente.

No presente trabalho, é importante salientar que das 50 amostras positivas para *S. aureus*, apenas uma continha 10^5 ou mais dessa bactéria por ml de leite (Tabela 4), valor este tido como limite, a partir do qual o alimento pode causar intoxicação alimentar estafilocócica. Para isto, obviamente, deve ocorrer a multiplicação de *S. aureus* produtor de enterotoxina no alimento.

A este respeito, porém, alguns autores como PETERSON e cols¹²⁴, (1962) consideram que para causar intoxicação alimentar, o alimento deve conter de 10^6 a 10^9 *S. aureus* por grama ou mililitro. Entretanto, segundo Hobbs (citado por JAY⁸⁸, 1973) para que isto ocorra, o número de *S. aureus* no alimento deve ser pelo menos 5×10^5 /g ou ml.

GILBERT⁶⁷ (1974) refere 53 surtos dessa doença, cujos alimentos associados, revelaram-se com contagens

de *S. aureus* de $1,2 \times 10^5$ a 10^9 ou mais por grama.

Porém, Donnelly e cols, em 1966 (citados por JAY⁸⁸, 1973) constataram que em leite, para que possa haver a produção de enterotoxina em quantidades detectáveis, é necessária a multiplicação de *S. aureus* atingindo números de 10^8 ou mais/ml. Por outro lado, segundo NOLETO & BERGDOLL¹¹⁸ (1980), para se detectar esse produto tóxico em leite é necessário se ter uma contagem de pelo menos 10^7 /ml do produto.

A contagem alta de *S. aureus* enterotoxigênico no alimento é importante porque, para causar intoxicação alimentar deve ocorrer a produção de enterotoxina em quantidades capazes de promover o surgimento de sintomas de intoxicação.

Segundo DACK⁴¹ (1964) a suscetibilidade das pessoas à enterotoxina estafilocócica é variável e num surto de intoxicação alimentar, se existe um grande número de estafilococos no alimento suspeito, é muito provável que tal surto se deva a estafilococos enterotoxigênicos.

A quantidade de enterotoxina necessária para produzir um quadro de intoxicação alimentar é variável segundo diferentes pesquisadores. Assim, CASMAN & BENNETT²⁸ (1965) e ANGELOTTI³ (1969), consideram que tal quantidade deva ser de 1 a 4 μg e 1 a 5 μg , respectivamente. Porém, BERGDOLL¹⁴ (1973) ressalta que a ingestão de quantidades de enterotoxina até inferiores a 1 μg podem determinar o surgimento de sintomas e que qualquer método empregado na detecção desse produto tóxico, deve ter sensibilidade suficiente para poder detectar essa quantidade.

Com relação ao leite, alguns pesquisadores, em outros países, demonstraram percentagens variáveis de isolamento de cepas de *S. aureus*, produtoras de enterotoxina.

Assim, FERNANDEZ⁵⁷ (1966) verificou que de 18 cepas de estafilococos coagulase-positivos isolados de leite cru, 5 eram produtoras de enterotoxina estafilocócica.

CASMAN e cols³⁰, (1967) nos Estados Unidos, referem que, de 236 cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru e 51 de leite de vacas com mastite, cerca de 10% e 2%, respectivamente, eram produtoras de enterotoxina.

OLSON e cols¹¹⁹, (1970) constataram que de 157 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, nos Estados Unidos e Canadá, 23 (14,6%) produziam enterotoxina estafilocócica, sendo 11 produtoras do tipo C, 11 do tipo D e uma dos tipos C e D, concomitantemente.

Na Índia, GHOSH & LAXMINARAYANA⁶⁵ (1972), isolaram 119 cepas de *S. aureus*, de 560 amostras de leite, obtidas diretamente do úbere de vacas e 100 de 160 de leite cru colhidas no comércio, das quais, 5,9% e 7%, respectivamente, revelaram-se produtoras de enterotoxina estafilocócica. Constataram nesse estudo, a presença de cepas produtoras de enterotoxina dos tipos A, B e AB, concomitantemente.

Na Inglaterra, WIENEKE¹⁵³ (1974), pesquisando a propriedade enterotoxigênica de cepas de *S. aureus* isoladas de vários alimentos, constatou que de 50 cepas isoladas de leite cru, 3 (6%) revelaram-se produtoras de enterotoxina do tipo D.

Em um estudo realizado na Espanha, GARCIA e cols⁶², (1980) referem que de 57 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, 4 (7,0%) produziam enterotoxina, sendo 3 do tipo C e 1 do tipo D.

No Japão, KATO & KUME⁹⁴ (1980) observaram que de 1056 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas que reagiram positivamente ao "California Mastitis Test" (CMT), 363 (34,4%) produziam enterotoxina dos tipos A, B, C ou D, sendo a maioria, ou seja, 197 (54,3%) produtoras do tipo C, isoladamente ou em associação com outros tipos.

LOMBAI e cols¹⁰³, (1980) observaram que de 101 cepas de *S. aureus* isoladas de leite, 11% eram produtoras de enterotoxina dos tipos A, C e D. Esses autores salientam que nenhuma cepa isolada de vacas assintomáticas para mastite, revelou-se produtora de enterotoxina estafilocócica, ao passo que das 6 cepas isoladas de leite de vacas com mastite, 4 produziam enterotoxina do tipo C.

No Japão, TAKESHIGE e cols¹⁴⁸, (1983) em 87 cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de casos de mastite bovina, evidenciaram 29 (33,3%) produtoras de enterotoxina estafilocócica dos tipos A, B e C, das quais 24 (82,8%) produziam o tipo C.

KUMAR & GUPTA⁹⁶ (1983), na Índia, num estudo sobre a capacidade enterotoxigênica de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, constataram que das 30 obtidas a partir de leite de vaca, 7 (23,3%) eram produtoras de enterotoxina estafilocócica, sendo 3 do tipo A, uma do C, uma do D e 2 produtoras dos tipos BD e CD, respectivamente.

Na presente investigação, analisando-se a ta

bela 4, observa-se que apenas de uma (1,0%) amostra de leite obteve-se o isolamento de *S. aureus* produtor de enterotoxina do tipo B, proporção essa inferior às obtidas nos estudos realizados pelos autores referidos. Cumpre salientar que essa amostra continha entre 10^2 e 10^3 *S. aureus* por ml de leite e mais especificamente 860/ml. Dessa amostra, foram isoladas 5 cepas desta bactéria, das quais apenas uma revelou-se produtora de enterotoxina. Admitindo-se que as 5 cepas isoladas representavam o total de colônias da placa de contagem, dos 860 *S. aureus*/ml de leite, 172/ml poderiam ser considerados enterotoxigênicos, não se evidenciando, portanto, significado epidemiológico imediato com relação à possibilidade de ocasionar intoxicação alimentar estafilocócica.

Como já foi referido, as cepas de *S. aureus* presentes em leite cru, podem ter diferentes origens, incluindo, principalmente, animais e o homem.

HAJEK & MARSALIK⁷⁶ (1971) consideram que entre os estafilococos isolados do homem e dos animais existe sempre um biótipo específico. Entretanto, é possível o isolamento de cepas de origem humana também nos animais, assim como cepas de origem animal podem, mesmo excepcionalmente, ser isoladas a partir do homem.

A este respeito, ASHCAR⁶ (1974) estudando cepas isoladas de cães, verificou que muitas delas apresentavam características de biótipo "canino", porém uma pequena percentagem (13,6%) revelava-se com propriedades bioquímicas semelhantes às de origem humana, indicando que cães podem ser portadores de *S. aureus* do tipo "não canino", talvez "humano". De cepas de *S. aureus* isoladas do homem, es

tudadas por esse autor, nenhuma se comportou como biótipo "canino".

Levando-se em conta as origens prováveis canina, humana e bovina, alguns autores verificaram os comportamentos bioquímicos de cepas de *S. aureus* de tais origens, com o objetivo de serem determinados os correspondentes biótipos.

Assim, através de estudos realizados por vários autores como BROWN e cols²², (1967), HAJEK & MARSALEK^{73,74} (1969), ASHCAR^{5,6} (1969 e 1974), pode-se depreender que o biótipo canino, na maioria das vezes, forma colônias de cor branca em ágar simples, não utiliza a maltose e o manitol, não produz acetoina e forma colônias brancas em ágar cristal violeta; por outro lado, os biótipos humano e bovino, em geral, formam colônias amarelas em ágar simples, utilizam a maltose e o manitol e produzem acetoina; estes dois últimos biótipos em ágar cristal violeta podem formar colônias de cor amarela ou violeta, porém nos de origem humana predominam as de cor violeta e nos de origem bovina as amarelas.

Analisando-se a tabela 5 pode-se verificar que das 201 cepas de *S. aureus* estudadas, 198 (98,5%) formaram colônias de cor amarela em ágar simples, 175 (87,1%) produziam acetoina, 196 (97,5%) e 189 (94%) utilizaram a maltose e o manitol, respectivamente, e 142 (70,6%) e 56 (27,9%) formaram colônias de cor amarela e violeta, respectivamente.

Por estes resultados pode-se depreender que a grande maioria das cepas isoladas mostrou-se com comporta-

mento de biótipos de origem, provavelmente, humana ou bovina. Deve ser salientado assim, que através dessas provas, torna-se muito difícil fazer-se uma diferenciação entre estes dois biótipos, já que os resultados, de acordo com os autores citados são semelhantes em ambos os casos. Por outro lado, as cepas que se revelaram nas provas bioquímicas com comportamentos não coincidentes com os observados para biótipos humano e bovino, apresentaram resultados no seu conjunto, que não permitiram caracterizá-las como biótipo canino.

Como já foi referido, segundo MEYER^{109,110} (1966, 1967), HAJEK & MARSALEK^{73,74} (1969) e outros autores, a diferenciação dos biótipos pode ser feita através das provas de fagotipagem, coagulase em plasmas humano e bovino, fibrinolisisina, coloração de colônias em ágar simples e cristal violeta e da hemolisina.

Com base nesses pesquisadores, no presente estudo, considerando-se a diferenciação entre cepas de *S. aureus* de origem provável humana ou bovina, deu-se ênfase à realização das provas de fibrinolisisina, coagulase com plasmas humano e bovino e de fagotipagem, empregando-se os conjuntos básicos internacionais para cepas de origem humana e bovina, cujos resultados encontram-se nas tabelas 5 a 13.

Analisando-se a tabela 5, pode-se verificar que das 201 cepas estudadas, 125 (62,2%) revelaram-se positivas para a produção de fibrinolisisina, proporção esta maior do que as constatadas por FERNANDEZ⁵⁷ (1966) na Espanha (5,2%) em 58 cepas isoladas de leite cru e por TAKESHIGE e cols¹⁴⁸, (1983) no Japão (33,3%) de 87 isoladas de leite de vacas com mastite.

A alta positividade de isolamento de cepas de *S. aureus* com atividade fibrinolítica, pode significar a ocorrência de contaminação, principalmente, por cepas de origem humana considerando-se, evidentemente, somente os resultados dessa prova.

Quanto à prova de coagulase, verifica-se que 183 (91%) revelaram-se positivas em plasma humano e 87 (43,3%) em plasma bovino. Como já foi referido, na maioria das vezes o biótipo humano coagula somente o plasma humano e o bovino ambos os plasmas, mostrando, também, que as cepas estudadas podem ser em grande parte de origem humana. A este respeito, MEYER¹⁰⁹ (1966) verificou que de 1817 cepas de *S. aureus* isoladas do homem, todas coagulavam o plasma humano e apenas 3 (0,16%) também o do bovino; em contraposição, de 600 cepas isoladas de bovino, todas coagulavam o plasma humano e 449 (74,8%) também o do bovino.

Na tabela 6, procurou-se agrupar as cepas estudadas conforme o seu comportamento frente a essas três provas. Assim sendo, nessa tabela pode-se constatar, com base nos critérios estabelecidos no quadro 4, que 64 (31,8%) cepas poderiam ser consideradas como sendo de origem provável humana e 28 (13,9%) bovina. Por outro lado, 37 (18,4%) e 54 (26,9%) cepas seriam tidas como intermediárias, porém, com tendência a serem, provavelmente, de origem humana e bovina, respectivamente.

Pelos resultados obtidos, para 18 (9%) cepas não houve possibilidade de caracterizar-se a sua origem provável e, assim sendo, foram consideradas como intermediárias.

Quanto à fagotipagem, analisando-se a tabela 7, verifica-se que apesar de um elevado número de cepas de *S. aureus* se mostrarem sensíveis a 1 ou mais fagos do Conjunto Básico Internacional Humano, 35 (17,4%) não reagiram com nenhum dos fagos desse conjunto. Por outro lado, observando-se a tabela 8, constata-se que ocorreu um menor número de cepas não tipáveis, pois, apenas 23 (11,4%) não foram sensíveis a nenhum dos fagos do Conjunto Básico Internacional para cepas de origem bovina. Esses resultados concordam com as observações de pesquisadores de outros países, os quais demonstraram que a maioria das cepas de *S. aureus* isoladas de leite apresentava menor sensibilidade aos fagos do Conjunto Básico Humano (SETO & WILSON¹³⁷, 1958; NAKAGAWA¹¹⁶, 1960; DAVIDSON⁴⁵, 1961; MARKHAM & MARKHAM¹⁰⁵, 1966).

Nessas tabelas, observa-se, também, uma alta variabilidade quanto aos fagótipos obtidos e que muitas cepas apresentaram-se como fagótipos complexos, ou seja, foram sensíveis a um elevado número de fagos, fato este verificado com relação a ambos os Conjuntos Básicos Internacionais empregados. Observações semelhantes foram feitas por DAVIDSON⁴⁵ (1961) o qual verificou que cepas de *S. aureus* isoladas a partir de leite, mostravam-se sensíveis até a 18 fagos.

A este respeito, SMITH¹⁴⁰ (1948) demonstrou que duas cepas de *S. aureus* de fagótipos diferentes, cultivadas em meio líquido, podem ter seus fagótipos modificados, fato que poderia ocorrer também em condições naturais.

Diante disso, no presente estudo, o encontro de fagótipos complexos poderia ser devido a uma facilidade de lisogenização das cepas com conseqüente modificação do

seu fagótipo pelo fato de estarem no leite, que é um meio líquido e rico em nutrientes.

Na fagotipagem realizada com o conjunto básico humano, verifica-se pela tabela 9 que das 201 cepas de *S. aureus* testadas, 68 (33,8%) foram lisadas por fagos do grupo III e 32 (15,9%) dos grupos III e NC, em associação, resultados semelhantes aos obtidos por RAHMAN & BAXI¹²⁶ (1983) em amostras de leite de vacas com mastite, na Índia. Por outro lado, com relação à fagotipagem efetuada com o conjunto básico bovino, pode-se constatar na tabela 10, que houve predominância de cepas lisáveis por fagos dos grupos III (16,9%) e IV (17,4%) isoladamente e em associação (12,4%). Estes resultados concordam com os verificados por GARCIA e cols⁶², (1980), em estudo realizado com 57 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, na Espanha.

No presente estudo, as 68 cepas sensíveis, exclusivamente, a fagos do grupo III e as 32 dos grupos III/NC em associação, pertencentes ao Conjunto Básico Internacional Humano, foram isoladas de 31 (62%) e 22 (44%) amostras de leite positivas para *S. aureus*, provenientes de 26 (72,2%) e 20 (55,6%) propriedades, respectivamente (tabela 9). De outra parte, as 34 (16,9%) cepas que foram lisadas somente por fagos do grupo III, as 35 (17,4%) unicamente do grupo IV e as 25 (12,4%) sensíveis a fagos dos grupos III e IV em associação, pertencentes ao Conjunto Básico Internacional Bovino, foram isoladas de 18 (36%), 14 (28%) e 15 (30%) amostras positivas para *S. aureus* oriundas de 17 (47,2%), 13 (36,1%) e 14 (38,9%) propriedades positivas, respectivamente.

Estes resultados mostram uma razoável distri

buição nas propriedades que forneceram os latões de leite, dos quais foram colhidas as amostras examinadas, de cepas lisáveis por fagos dos grupos III e III/NC do conjunto básico humano e por fagos dos grupos III, IV e III/IV do conjunto básico bovino.

Entretanto, deve ser salientado que 35 (17,4%) cepas isoladas de 19 (38%) amostras de leite positivas para *S. aureus*, obtidas de latões provenientes de 16 (44,4%) propriedades positivas, mostraram-se não tipáveis frente aos fagos do conjunto básico humano (tabela 9). O mesmo ocorreu com relação a 23 (11,4%) cepas isoladas de 13 (26,0%) amostras de leite positivas para aquela bactéria, colhidas de latões oriundos de 12 (33,3%) propriedades positivas, frente ao conjunto básico bovino (tabela 10).

Por outro lado, através da análise da tabela 13, considerando-se os resultados das provas realizadas com fagos pertencentes a ambos os conjuntos, humano e bovino, apenas 19 (9,4%) cepas mostraram-se não tipáveis. Isto mostra mais uma vez que aumentando-se o número de fagos, nas provas de fagotipagem, pode-se obter uma proporção maior de cepas tipáveis.

Ainda com relação à fagotipagem, serão feitos alguns comentários considerando-se, para as cepas estudadas, os resultados obtidos frente à utilização dos conjuntos básicos internacionais humano e bovino, isoladamente ou em associação.

Assim, da análise da tabela 11 pode-se constatar que através do emprego do Conjunto Básico Internacional Humano, das 201 cepas de *S. aureus* estudadas, 113 (56,2%)

mostraram-se sensíveis a fagos deste conjunto na diluição a 1 X RTD e das 88 (43,8%) cepas restantes, às quais usou-se a diluição 100 X RTD, 53 (26,4%) foram tipáveis.

Considerando-se o total das cepas submetidas à fagotipagem nas 2 diluições (1 X RTD e 100 X RTD), observa-se que 166 (82,6%) foram tipáveis, sendo 123 (61,2%) sensíveis a fagos pertencentes, exclusivamente, ao conjunto humano e a fagos comuns aos conjuntos humano e bovino, 16 (8,0%) a fagos pertencentes, unicamente, ao conjunto humano e 27 (13,4%) a fagos comuns a ambos os conjuntos. Assim, utilizando-se na fagotipagem apenas o conjunto básico humano, verifica-se que 139 (69,2%) cepas poderiam ser consideradas como sendo de origem humana. Por outro lado, deve-se salientar que para 62 (30,8%) cepas incluindo as 27 acima citadas e as não tipáveis, não se pode caracterizar a sua origem provável, empregando-se apenas o conjunto básico humano.

Analisando-se de forma similar a tabela 12, na qual as cepas estudadas estão distribuídas segundo a sensibilidade aos fagos do conjunto básico bovino, observa-se que 149 (74,1%) foram sensíveis a fagos a 1 X RTD, 29 (14,4%) a 100 X RTD e 23 (11,4%) não tipáveis.

Considerando-se os resultados obtidos frente às 2 diluições de fagos, verifica-se ainda que, 62 (30,8%) cepas foram sensíveis a fagos pertencentes, exclusivamente, ao conjunto bovino e a fagos comuns aos conjuntos humano e bovino, 58 (28,9%) a fagos unicamente do conjunto bovino, e 58 (28,9%) a fagos comuns a ambos os conjuntos. Assim, levando-se em conta apenas os resultados da fagotipagem frente aos fagos do conjunto básico bovino poderiam ser relacio

nadas como sendo provavelmente de origem bovina, 120 (59,7%) cepas. Todavia, para as 58 (28,9%) cepas que reagiram com fagos comuns aos conjuntos humano e bovino e as 23 (11,4%) não tipáveis, totalizando 81 (40,3%) cepas, não se pode definir a sua origem provável.

Analisando-se a tabela 13, e de acordo com os critérios estabelecidos no quadro 5, observa-se, que, 28 (13,9%) e 38 (19,0%) cepas revelaram-se sensíveis a fagos, que do ponto de vista da fagotipagem, mostraram-se com comportamento de cepas de origens humana e bovina, respectivamente. Verifica-se, ainda, que 26 (12,9%) e 27 (13,4%) cepas foram consideradas intermediárias com tendência, respectivamente, à origem humana e bovina e 58 (28,9%) foram tidas como intermediárias.

Por outro lado, 5 (2,5%) cepas por apresentam sensibilidade somente a fagos comuns aos 2 conjuntos, foram consideradas como sendo de origem humana ou bovina.

A fim de poder melhor caracterizar a origem provável das cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de leite examinadas, associaram-se os resultados obtidos, de acordo com os critérios bioquímicos e de fagotipagem mostrados nos quadros 4, 5 e 6.

A esse respeito, pode-se verificar na tabela 14, que das 201 cepas de *S. aureus* isoladas de leite, 40 (19,9%) e 21 (10,4%) mostraram-se, frente às provas bioquímicas e de fagotipagem, com características relacionadas tipicamente com o comportamento das cepas de origem humana e bovina, respectivamente. Por outro lado, 36 (17,9%) e 56 (27,9%) cepas mostraram-se frente a essas provas, como in-

intermediárias, porém com alguma característica indicativa de origem humana e bovina, respectivamente. As 48 (23,9%) restantes foram classificadas também como intermediárias, porém não houve possibilidade de caracterizá-las quanto à sua origem provável. Possivelmente, a contaminação por *S. aureus* de origem humana se deva a problemas relacionados às condições higiênicas de manipulação desse leite e à provável presença de portadores dessa bactéria entre os manipuladores.

Pelos resultados obtidos, pode-se verificar nessa mesma tabela que somando-se as 40 (19,9%) cepas com origem provável humana com 36 (17,9%) intermediárias humanas, resulta 76 (37,8%) cepas que tiveram sua origem provavelmente humana. Fazendo-se igual análise com relação às 21 (10,4%) de origem provável bovina com as 56 (27,9%) intermediárias bovinas, resulta em 77 (38,3%) cepas de origem, provavelmente, bovina.

Tais resultados sugerem, participação semelhante do homem e do bovino, na contaminação constatada nas amostras de leite analisadas.

Por outro lado as cepas de *S. aureus* de origem bovina, podem ter sido veiculadas a esse alimento através de bovinos assintomáticos (REID & WILSON¹³⁰, 1959; HAJEK & MARSALEK⁷³, 1969) ou por vacas com mastite (GEORGE e cols⁶⁴, 1962; OLSON e cols¹¹⁹, 1970; OLSVIK e cols¹²¹, 1981).

Na tabela 15 pode-se constatar que das 21 cepas de *S. aureus* classificadas como de origem bovina, 20 (95,2%) produziam colônias amarelas e 1 (4,8%) colônias brancas, em ágar cristal violeta, concordando, assim, com as ob

servações de MEYER¹¹¹ (1967) o qual observou que a maioria das cepas de origem bovina forma colônias de cor amarela em ágar cristal violeta.

Por outro lado, na mesma tabela, evidencia-se que das 40 cepas de *S. aureus* de origem humana, 21 (52,5%) produziram colônias amarelas e 19 (47,5%) colônias violetas, sugerindo, portanto, ser esta uma prova que não permite, de forma isolada, a identificação de cepas de *S. aureus* de origem humana.

Deve-se salientar que, como já foi referido, das amostras de leite analisadas, isolou-se apenas 1 (1%) cepa enterotoxigênica. Tal cepa apresentou as seguintes características: positiva nas provas de termonuclease, acetoina, manitol (em aerobiose e anaerobiose), maltose (em aerobiose), fibrinolisinase e coagulase em plasma humano; negativa na prova de coagulase em plasma bovino, e produtora de colônias amarelas em ágar simples e ágar cristal violeta. Esta cepa mostrou-se sensível ao fago 53 comum aos grupos III dos conjuntos básicos humano e bovino. Levando-se em conta tais características, tal cepa foi considerada como de origem provavelmente humana.

Face aos resultados obtidos na presente investigação, novos estudos devem ser realizados a respeito, fazendo-se também a necessária adoção de medidas higiênico-sanitárias, nem sempre fáceis de serem aplicadas, visando a obtenção de leite com melhor qualidade bacteriológica, a fim de se reduzir, ao máximo, a contaminação desse produto por *S. aureus*.

Assim sendo, devem ser reforçadas as medidas

relativas à educação sanitária dos manipuladores desse alimento, como por exemplo, cuidados relacionados à higiene do ordenhador, a fim de evitar a contaminação por cepas de S. aureus, de origem humana. Cuidados na limpeza dos utensílios utilizados na ordenha e no transporte do leite, bem como, o resfriamento e o transporte rápido à usina são também medidas desejáveis. Relativamente aos rebanhos leiteiros, devem ser salientadas medidas higiênicas que visem a reduzir a contaminação do leite, muitas das quais, relacionadas ao controle da mastite, como os cuidados de limpeza e de assepsia, antes da ordenha, assim como da pele que recobre o úbere e os tetos. Deve-se, ainda, evitar a inclusão na ordenha de vacas que apresentem mastite nas diferentes formas clínicas, as quais deverão ser ordenhadas à parte e tratadas adequadamente.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e a discussão desenvolvida no presente estudo, esperamos ter contribuído com algumas informações de interesse, com relação ao conhecimento da ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênico em leite cru, assim como sobre as características bioquímicas e de fagotipagem de cepas isoladas, a partir desse produto, na tentativa de caracterizar a sua origem provável, humana ou animal. Essas informações podem ser resumidas nas seguintes conclusões:

1. Das 100 amostras de leite cru, obtidas na plataforma de recepção da Usina do Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias (CIZIP) de Pirassununga, SP, a partir de latões oriundos de 53 propriedades que compunham as 5 linhas de leite existentes, 50 (50%) revelaram-se positivas para *S. aureus*, taxa esta que pode ser considerada alta.
2. Das 53 propriedades, 36 (67,9%) revelaram-se com amostras de leite positivas para *S. aureus*, sendo observada uma grande variação do número dessa bactéria, ou seja, de 30 a 110.000 por mililitro.
3. Apenas de uma (1,0%) amostra de leite, contendo 860 *S. aureus*/ml, isolou-se uma cepa enterotoxigênica desta bactéria, a qual era produtora de enterotoxina do tipo B. Esta cepa foi considerada como sendo de origem provável

mente humana, por ter-se revelado positiva nas provas da acetoina, do manitol, maltose, fibrinolisinase e coagulase em plasma humano e negativa na prova de coagulase em plasma bovino; esta cepa era produtora de colônias amarelas em ágar simples e em ágar cristal violeta e sensível ^{Doente} ao fago 53, comum aos Conjuntos Básicos Internacionais Humano e Bovino.

4. Das 201 cepas de *S. aureus* isoladas, 64 (31,8%) e 28 (13,9%) mostraram-se com características bioquímicas, frente às provas de fibrinolisinase, coagulase em plasmas humano e bovino, relacionadas à origem humana e bovina, respectivamente.
5. Um elevado número de cepas de *S. aureus* isoladas, foi lisado tanto por fagos do Conjunto Básico Internacional para cepas de origem humana como do Conjunto Básico Internacional para cepas de origem bovina, identificando-se um grande número de fagótipos, muitos dos quais sensíveis a diversos fagos e não sendo tipáveis 35 (17,4%) e 23 (11,4%) cepas, frente aos conjuntos humano e bovino, respectivamente.
6. Pelo critério da fagotipagem, verificou-se que 28 (13,9%) e 38 (19,0%) cepas de *S. aureus* apresentavam comportamento indicativo de origem provável humana e bovina, respectivamente, e as demais cepas não puderam, por esse método, ter sua origem provável caracterizada.
7. Das cepas estudadas, houve predominância das lisáveis por fagos dos grupos III isoladamente (33,8%) e dos gru

pos III/NC em associação (15,9%), frente ao conjunto básico humano. Por outro lado, com o conjunto básico bovino, observou-se maior freqüência de cepas sensíveis a fagos dos grupos III (16,9%), IV (17,4%) e III/IV, em associação (12,4%).

8. Associando-se os resultados das provas bioquímicas da fibrinolisisina, coagulase em plasma humano e bovino e da fagotipagem com os conjuntos básicos humano e bovino, 40 (19,9%) e 21 (10,4%) cepas apresentaram comportamento relacionado às origens prováveis humana e bovina, respectivamente; 36 (17,9%) e 56 (27,9%) cepas foram classificadas como intermediárias com maior tendência, respectivamente, a serem de origem humana e bovina, enquanto as 48 (23,9%) restantes foram definidas como intermediárias, por não ter sido possível caracterizar nem a sua origem provável e nem a sua tendência, humana ou bovina.
9. Das 21 cepas classificadas pelas provas bioquímicas e pela fagotipagem como de provável origem bovina, a grande maioria (95,2%) produziu colônias de cor amarela frente à prova do cristal violeta. Em contraposição, das 40 cepas de origem provável humana, 52,5% e 47,5% formaram colônias amarelas e violetas, respectivamente, mostrando uma limitação dessa prova, quanto à sua aplicabilidade, na caracterização de cepas de origem provável humana.
10. Verificou-se, pelos resultados obtidos no estudo das cepas isoladas uma participação importante, tanto dos bou

vinos quanto do homem, relativamente à origem da conta
minação por **S. aureus**, constatada nas amostras de leite
analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED, A.A. et al. Enterotoxigenicity of staphylococcal strains isolated from milk and dairy products. **Arch. Lebensmitt.-Hyg.**, 29: 212-4, 1978.
2. ANDERSON, P.H.R. & STONE, D.M. Staphylococcal food poisoning associated with spray-dried milk. **J. Hyg.**, London, 53: 387-97, 1955.
3. ANGELOTTI, R. Staphylococcal intoxications. In: RIEMAN, H., ed. **Food-borne infections and intoxications**. New York, Academic Press, 1969, p. 359-93.
4. ARMIJO, R. et al. Food poisoning outbreaks associated with spray-dried milk: an epidemiologic study. **Amer. J. publ. Hlth** , 47: 1093-100, 1957.
5. ASHCAR, H. **Staphylococcus aureus**. Avaliação de provas para sua identificação. Diferenças de comportamento bioquímico entre amostras de origem humana e animal. São Paulo, 1969. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
6. ASHCAR, H. Contribuição ao estudo das propriedades bioquímicas de **Staphylococcus aureus** de origem humana, canina e de outros animais. São Paulo, 1974. [Tese de Livre-Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

7. BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. appl. Bact.*, 25: 12-19, 1962.
8. BAIRD-PARKER, A.C. Methods for classifying staphylococci and micrococci. In: GIBBS, B.M. & SKINNER, F.A., ed. *Identification methods for microbiologists*. London, Academic Press, 1966. p. 59-64.
9. BAIRD-PARKER, A.C. Gram positive cocci. In: BUCHANAN, E.E. & GIBBONS, N.E. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p. 478-528.
10. BARRY, A.L. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.*, 25: 496-7, 1973.
11. BEHMER, M.L.A. *Tecnologia do leite*. 10.ed. São Paulo, Nobel, 1980.
12. BENNETT, R.W. et al. Staphylococcal enterotoxin: a comparative study of serological detection methods. *J. canad. Inst. Food Sci. Technol.*, 6: 131-4, 1973.
13. BERDALL, B.P. et al. A sandwich ELISA methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Acta path. microbiol. scand., Sect. B*, 89: 411-5, 1981.

14. BERGDOLL, M.S. enterotoxin detection. In: HOBBS, B. C. & CHRISTIAN, J.H.B., ed. **The microbiological safety of food**. New York, Academic Press, 1973. p. 287-92.
15. BERGDOLL, M.S. et al. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin. **J. Bact.**, 90: 1481-5, 1965.
16. BERGDOLL, M.S. et al. The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative microorganism. **Bact. Proc.**, 67: 12, 1967.
17. BERGDOLL, M.S. et al. Identification of enterotoxin E. **Infect. Immun.**, 4: 593-5, 1971.
18. BERGDOLL, M.S. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome **Staphylococcus aureus** isolates. **Lancet**, 1: 1017-21, 1981.
19. BILLING E. & LUCKHURST, E.R. A simplified method for the preparation of egg-yolk media. **J. appl. Bact.**, 20: 90, 1957.
20. BLAIR, J.E. & WILLIAMS, R.E.O. Phage typing of staphylococci. **Bull. Wld Hlth Org.**, 24: 771-84, 1961.
21. BRACHMAN, P.S. et al. Food poisoning in the U.S.A. In: HOBBS, B.C. & CHRISTIAN, J.H.B., ed. **The**

microbiological safety of food. New York, Academic Press, 1973. p. 143-51.

22. BROWN, R.W. et al. Differentiation of strains of **Staphylococcus epidermidis** isolated from bovine udders. **J. gen. Microbiol.**, 47: 273-87, 1967.
23. BRYCE, L.M. & ROUNTREE, P.M. The production of β -toxin by staphylococci. **J. Path. Bact.**, 43: 173-89, 1936.
24. BUKOVIC, J.A. & JOHNSON, H.M. Staphylococcal enterotoxin C: solid-phase radioimmunoassay. **Appl. Microbiol.**, 30: 700-1, 1975.
25. CABRAL, T.M.A. et al. Bactérias mesófilas coliformes totais e fecais e **Staphylococcus aureus** em queijo "coalho" comercializado em João Pessoa, Paraíba.
In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. **Programa. Resumos.** São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p.157.
26. CASMAN, E.P. Staphylococcal food poisoning, **Hlth Lab. Sci.**, 4: 199-206, 1967.
27. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. **J. Bact.**, 86: 18-23, 1963.

28. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, 13: 181-9, 1965.
29. CASMAN, E.P. et al. Designation of staphylococcal enterotoxins. *J. Bact.*, 85: 715-6, 1963.
30. CASMAN, E.P. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bact.*, 94: 1875-82, 1967.
31. CASTRO, M.M.M.V. & IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do Município de João Pessoa, PB. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 18: 235-45, 1984.
32. CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. & IARIA, S.T. Contagem de *Staphylococcus aureus* em carne moída e verificação da produção de enterotoxina pelas cepas isoladas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12. São Paulo, 1983. **Programa. Resumos.** São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 146.
33. CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. et al. Grupos de microrganismos em amostras de leite pasteurizado, vendido na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. **Programa. Resu**

- mos. São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 146.
34. CHAPMAN, G.H. & BERENS, C. Crystal violet agar as a differential medium for staphylococci. *J. Bact.*, **29**: 437-48, 1935.
35. CHRISTIAN, J.H.B. Reduced water activity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microbial ecology of foods: factor affecting life and death of microorganisms.** New York, Academic Press, 1980. v.1, p. 70-91.
36. CHRISTIE, R. & WILSON, H. A test of staphylococcal fibrinolysis. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **19**: 329-32, 1941.
37. COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN HIGIENE DE LA LECHE, Ginebra, 1969. **Tercer informe.** Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1971. (OMS - Ser. Inf. técn., 453).
38. CORLETT, D.A. & BROWN, M.H. pH and acidity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microbial ecology of foods: factor affecting life and death of microorganisms.** New York, Academic Press, 1980. v.1, p. 92-111.
39. COURTER, R.D. & GALTON, M.M. Animal staphylococcal

infections and their public health significance.

Amer. J. publ. Hlth, 52: 1818-27, 1962.

40. CROWLE, A.J. A simplified micro double diffusion agar precipitin technique. **J. Lab. clin. Med., 52: 784-7, 1958.**
41. DACK, G.M. **Food poisoning.** 3.ed. Chicago, University of Chicago Press, 1964. p. 109-58.
42. DACK, G.M. et al. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic **Staphylococcus.** **J. prev. Med., 4: 167-75, 1930.**
43. DACK, G.M. et al. An outbreak of food poisoning apparently due to staphylococci. **J. Amer. med. Ass., 105: 1598-9, 1935.**
44. DAVIDSON, I. Observations on the pathogenic staphylococci in a dairy herd during a period of six years. **Res. vet. Sci., 2: 22-40, 1961.**
45. DAVIDSON, I. A set of bacteriophages for typing bovine staphylococci. **Res. vet. Sci., 2: 396-407, 1961.**
46. DAVISON, E. et al. Attempts to assay the enterotoxigenic substance produced by staphylococci by parenteral infection of monkeys and kittens. **J. infect. Dis., 52: 219-23, 1938.**

47. DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* entero-patogênico em macarrão. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 7: 485-97, 1976.
48. DENNY, C.B. et al. Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Sci.*, 31: 762-7, 1966.
49. DICKIE, N. & THATCHER, F.S. severe food-poisoning from malted milk and a isolation of a hitherto unknown toxin. *Canad. J. publ. Hlth*, 58: 25, 1967:
50. DOLMAN, C.E. & WILSON, R.J. Experiments with staphylococcal enterotoxin. *J. Immunol.*, 35: 13-30, 1938.
51. DOLMAN, C.E. et al. A new method of detecting *Staphylococcus* enterotoxin. *Canad. publ. Hlth J.*, 27: 489-93, 1936.
52. DONNELLY, C.B. et al. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15: 1382-7, 1967.
53. EDDY, C.A. The frog test for staphylococcal enterotoxin. *Proc. Soc. exper. Biol.*, New York, 78: 131-4, 1951.
54. ELEK, S.D. & LEVY, E. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Path. Bact.*, 62: 541-54, 1950.

55. EVANS, J.B. Studies of staphylococci with special reference to the coagulase-positive types. *J. Bact.*, 55: 793-800, 1948.
56. EVANS, J.B. et al. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bact.*, 60: 481-4, 1950.
57. FERNANDEZ, G.S. Microflora estafilococica de leche natural. *An. Fac. Vet. León*, 12: 11-166, 1966.
58. FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. *Food microbiology*. 3 ed. New York, McGraw-Hill, 1978. p. 432-8.
59. FREITAS, D.C. et al. Estudo sobre estafilococos patogênicos isolados de cães. *Rev. Fac. Med. vet.*, S. Paulo, 7: 371-6, 1965.
60. FRIEDMAN, M.E. & WHITE, J.D. Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B. *J. Bact.*, 89: 1155, 1965.
61. FURLANETTO, S.M.P. et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* em queijo frescal, vendido em supermercado do Município de São Paulo. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. Programa. Resumos, São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 144.

62. GARCIA, M.L et al. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Appl. environm. Microbiol.**, 39: 548-53, 1980.
63. GASPAR JR., J.C. Algumas características de cepas de **Staphylococcus aureus** isoladas de manipuladores de alimentos em hospitais e de amostras de doces cremosos, lingüiça e pescado. São Paulo, 1982. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
64. GEORGE, C.S. et al. Characteristics of staphylococci from bovine milk. **J. infect. Dis.**, 110: 75-9, 1962.
65. GHOSH, S.S. & LAXMINARAYANA, H. Enterotoxigenic staphylococci in milk and milk products. **Indian J. anim. Sci.**, 42: 492-8, 1972.
66. GHOSH, S.S. & LAXMINARAYANA, H. Incidence and distribution of staphylococci in milk and milk products. **Indian J. anim. Hlth**, 13: 117-20, 1974.
67. GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning and botulism. **Postgrad. med. J.**, 50: 603-11, 1974.
68. GILBERT, R.J. & WIENEKE, A.A. Staphylococcal food poisoning with special reference to the detection of enterotoxin in food. In: HOBBS, B.C. & CHRISTIAN, J.H.B., ed. **The microbiological safety of food**. New York, Academic Press, 1973. p. 273-85.

69. GILBERT, R.J. et al. Serological detection of enterotoxin in foods implicated in staphylococcal food poisoning. *J. Hyg.*, London, **70**: 755-62, 1972.
70. GILLEPSIE, E.H. et al. Pathogenic staphylococci: their incidence in the nose and on the skin. *Lancet*, **2**: 870-3, 1939.
71. GLENNY, A.T. & STEVENS, M. F. Staphylococcus toxins and antitoxins. *J. Path. Bact.*, **40**: 201-10, 1935.
72. GOMEZ, R.I. et al. Incidencia de *S. aureus* en quesos a nivel de mercado en el Distrito Federal. *Rev. latino-amer. Microbiol.*, **21**: 67-8, 1979.
73. HAJEK, V. & MARSALEK, E. A study of staphylococci of bovine origin. *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **209**: 154-60, 1969.
74. HAJEK, V. & MARSALEK, E. A study of staphylococci isolated from the upper respiratory tract of different animal species. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **212**: 60-73, 1969.
75. HAJEK, V. & MARSALEK, E. Variability of the production of fibrinolysin in staphylococci of animal origin. *Folia Microbiol.*, Praha, **14**: 421-4, 1969.
76. HAJEK, V. & MARSALEK, E. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, **217**: 176-82, 1971.

77. HAJEK, V. & MARSALEK, E. The occurrence of enterotoxigenic **Staphylococcus aureus** strains in hosts of different animal species. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, 223: 63-8, 1973.
78. HALL, H.E. et al. Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by gel diffusion methods. *Publ. Hlth Rep., Washington*, 78: 1089-98, 1963.
79. HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. *Acta path. microbiol. scand.*, 63: 299-305, 1965.
80. HARRIETTE, D.V. & DUMOFF, M. Culture media. In: LENNETTE, E.H. et al. ed. **Manual of clinical microbiology**. 2. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974. p. 881-929.
81. HIROOKA, E.Y. & MÜLLER, E.E. Isolamento, caracterização e enterotoxigenicidade de cepas de **Staphylococcus aureus** isolados de produtos cárneos comercializados em Londrina, Paraná. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 2: 123-33, 1982.
82. HOBBS, B.C. & GILBERT, R.J. Food poisoning and food hygiene. 4. ed. London, Edward Arnold, 1978. p. 366.
83. HOPPER, S.H. Detection of **Staphylococcus** enterotoxin I. Flotation antigen-antibody system. *J. Food Sci.*, 28: 572-7, 1963.

84. IARIA, S.T. **Staphylococcus aureus** enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do Município de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde públ.**, S. Paulo, 15: 321-37, 1981.
85. IARIA, S.T. et al. Pesquisa de **Staphylococcus aureus** enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Rev. Saúde públ.**, S. Paulo, 14: 93-100, 1980.
86. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration.** 2. ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
87. JASPER, D.E. & JAIN, N.C. Hemolytic behaviour of staphylococci isolated from cow's milk. **Canad. J. comp. Med.**, 30: 63-70, 1966.
88. JAY, J.M. Toxinfecções alimentícias causadas por cocos gram-positivos. In: _____. **Microbiologia moderna de los alimentos.** Zaragoza, Acribia, 1973. p. 190-209.
89. JENNINGS, W.E. Food-borne illness. In: LIBBY, J.A., ed. **Meat hygiene.** 4. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1975. p. 261-95.
90. JENSEN, J.P. et al. Culture media preparation. In: MARTH, E.H. ed. **Standard methods for the examination of dairy products.** 14. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1978. p. 55-75.

91. JOHNSON, H.M. et al. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, **22**: 837-41, 1971.
92. JORDAN, E.O. & McBROOM, J. Results of feeding *Staphylococcus* filtrates to monkeys. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, **29**: 161-2, 1931.
93. KAPLAN, M.M. et al. Diseases transmitted through milk. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Milk hygiene: hygiene in milk production, processing and distribution*. Geneva, 1962. p. 11-74. (Monograph series, 48).
94. KATO, E. & KUME, T. Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California Mastitis Test-positive milk in Japan, *Jap. J. vet. Res.*, **28**: 75-85, 1980.
95. KELLY, F.C. & DACK, G.M. Experimental *Staphylococcus* food poisoning. A study of the growth of a food poisoning *Staphylococcus* and the production of an enterotoxin substance in bread and meat. *Amer. J. publ. Hlth*, **26**: 1077-82, 1936.
96. KUMAR, A. & GUPTA, R.S. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human sources. *Indian vet. J.*, **60**: 595-8, 1983.
97. LACHICA, R.V.F. et al. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting nuclease staphylococcal activity.

Appl. Microbiol., 21: 585-7, 1971.

98. LEÃO, R.L. **Higiene do leite; o leite como** veiculador de infecções no homem, medidas para assegurar sua inocuidade. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, 1937.
99. LESER, W. & PAIM, G.V. Leite e saúde pública. **Rev. Criad., 45: 60-1, 1975.**
100. LEVY, E. et al. Relation of bacteriophage pattern to some biological properties of staphylococci. **J. gen. Microbiol., 9: 97-100, 1953.**
101. LIVE, I. Differentiation of **Staphylococcus aureus** of human and canine origins: coagulation of human and of canine plasma, fibrinolysin activity and serologic reaction. **Amer. J. vet. Res., 33: 385-91, 1972.**
102. LOKEN, K.I. & HOYT, H.H. Studies on bovine staphylococcic mastitis. I. Characterization of staphylococci. **Amer. J. vet. Res., 23: 534-40, 1962.**
103. LOMBAI, G. et al. Properties and food hygiene significance on strains of **Staphylococcus aureus** isolated from udders of cows. **Arch. Lebensmitt.-Hyg., 31: 206-9, 1980.**
104. MARANDON, J.L. & OEDING, P. Investigations on animal

- Staphylococcus aureus** strains. 1. Biochemical characteristics and phage typing. *Acta path. microbiol. scand.*, **67**: 149-55, 1966.
105. MARKHAM, N.P. & MARKHAM, J.G. Staphylococci in man and animal. Distribution and characteristics of strains. *J. comp. Path.*, **76**: 49-56, 1966.
106. MARTIN, T.D.M. & WHITEHEAD, J.E.M. Carriage of penicillin-resistant **Staph. pyogenes** in healthy adults. *Brit. med. J.*, **1**: 173-5, 1949.
107. MCFARLAN, A.M. Incidence of pathogenic staphylococci in the nose. *Brit. med. J.*, **2**: 939-41, 1938.
108. MEYER, W. Differenzierungsschema für Standortvarianten von **Staphylococcus aureus**. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **201**: 465-81, 1966.
109. MEYER, W. über die brauchbarkeit des koagulase-testes mit verschiedenen plasincartem zur differenzierung von **Staphylococcus aureus** - stämmen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **201**: 331-38, 1966.
110. MEYER, W. A proposal for subdividing the species **Staphylococcus aureus**. *Int. J. syst. Bact.*, **17**: 387-9, 1967.
111. MEYER, W. über die brauchbarkeit des kristallviolett-testes zur differenzierung von **Staphylococcus**

- aureus** - stämmen. *Z. med. Mikrobiol. Immunol.*, 153: 158-68, 1967.
112. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. III. Staphylococci in dairy foods. *J. Milk Food Technol.*, 35: 77-82, 1972.
113. MORRISON, S.M. et al. *Staphylococcus aureus* in domestic animal. *Publ. Hlth Rep.*, Washington, 76: 673-7, 1961.
114. MORSE, S.A. & MAH, R.A. Microtiter hemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Microbiol.*, 15: 58-61, 1967.
115. MUNCH-PETTERSEN, E. Staphylococci in food and food intoxication. A review and a appraisal of phage typing rests. *J. Food Sci.*, 28: 692-710, 1963.
116. NAKAGAWA, M. Studies on bacteriophage typing of a staphylococci isolated from bovine milk. III. Typing by means of a new phage set. *Jap. J. vet. Res.*, 8: 331-42, 1960.
117. NASCIMENTO, D. Contribuição ao conhecimento das condições bacteriológicas de amostras de leite tipo C, antes e após a pasteurização, vendido na cidade de João Pessoa, PB, 1977/8. São Paulo, 1982. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

118. NOLETO, A.L. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. *Appl. env. Microbiol.*, 39: 1167-71, 1980.
119. OLSON, J.C. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, 20: 605-7, 1970.
120. OLSON JR., J.C. & MOCQUOT, G. Milk and milk products. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial ecology of foods: food commodities*. New York, Academic Press, 1980. v.2, p. 470-8.
121. OLSVIK, O. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. *Acta path. microbiol. scand.*, Sect. B, 89: 423-6, 1981.
122. PAIK, G. & SUGGS, M.T. Reagents, strains and miscellaneous test procedures. In: LENNETTE, E. H. et al. *Manual of clinical microbiology*. 2. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974. p. 930-50.
123. PARKER, M.T. & LAPAGE, S.P. Penicillinase production by *Staphylococcus aureus* strains from outbreaks of food poisoning. *J. clin. Path.*, 10: 313-7, 1957.
124. PETERSON, A.C. et al. Staphylococci in competition.

- I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. *Appl. Microbiol.*, 10: 16-22, 1962.
125. PINEIRO, E.L. Leite pasteurizado e esterilizados na alimentação humana. *Industr. aliment.*, S. Paulo, 2(7): 38-9, 1977.
126. RAHMAN, H. & BAXI, K.K. Studies on staphylococcal mastitis in bovine. *Indian vet. J.*, 60: 865-9, 1983.
127. READ, R.B. & BRADSHAW, J.G. Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk. *J. Dairy Sci.*, 49: 202-3, 1966.
128. READ, R.B. et al. Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese. *J. Dairy Sci.*, 48: 420-4, 1965.
129. READ, R.B. et al. In vitro assay of staphylococcal enterotoxins A and B from milk. *J. Dairy Sci.*, 48: 411-9, 1965.
130. REID, W.B. & WILSON, J.B. A study of the staphylococci associated with the bovine udder. *Amer. J. vet. Res.*, 20: 825-31, 1959.
131. RIGDON, R.G. Observations on Dolman's test for determining the presence of staphylococcal enterotoxin. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 38: 82-4, 1938.

132. ROBBINS, R. et al. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, **28**: 946-50, 1974.
133. ROBINSON, J. & THATCHER, F.S. Determination of staphylococcal enterotoxin by an indirect hemagglutination inhibition procedure. *Bact. Proc.*, **65**: 72, 1965.
134. ROBINSON, E.D. The effect of staphylococcal enterotoxin upon the frog (*Rana pipiens*). *Proc. Soc. exper. Biol.*, New York, **72**: 265-6, 1949.
135. ROUNTREE, P.M. & BARBOUR, R.G.H. Nasal carrier rates of *Staphylococcus pyogenes* in hospital nurses. *J. Path. Bact.*, **63**: 313-24, 1951.
136. RUDGE, A.C. Aspectos microbiológicos e sanitários de lingüiça tipo frescal: análise da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Botucatu, 1980. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".]
137. SETO, J.T. & WILSON, J.B. Bacteriophage typing of micrococci of bovine origin. *Amer. J. vet. Res.*, **19**: 241-6, 1958.
138. SIMKOVICOVA, M. & GILBERT, R.J. Serological detection of enterotoxin from food-poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. *J. med. Microbiol.*, **4**: 19-30, 1971.

139. SMITH, D.T. et al. Los estafilococos. In: SMITH, D.T. **Microbiologia de Zinsser**. 4. ed. México, Hispano-Americana, 1971. p. 548-76.
140. SMITH, H.W. Investigations on the typing of staphylococci by means of bacteriophage. II. The significance of lysogenic strains in staphylococcal type designation. **J. Hyg.**, London, **46**: 82-9, 1948.
141. SOLÉ-VERNIN, C. Fagotipagem de **Staphylococcus aureus**. **Rev. bras. Ortop.**, Rio de Janeiro, **11**: 31-4, 1976.
142. SPENCER, G.R. & LASMANIS, J. Reservoirs of infection of **Micrococcus pyogenes** in bovine mastitis. **Amer. J. vet. Res.**, **13**: 500-3, 1952.
143. SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of **Staphylococcus aureus**. **Appl. Microbiol.**, **29**: 502-5, 1975.
144. SPREER, E. **Lactologia industrial**. 2.ed. Zaragoza, Acribia, 1975.
145. STIFFLER-ROSENBERG, G. & FEY, H. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. **J. clin. Microbiol.**, **8**: 473-9, 1978.
146. SUBCOMMITTEE on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Minutes of First Meeting (5th-6h

October, 1964). *Int. Bull. bact. Nomencl.*, 15:
107-8, 1965.

147. SURGALA, M.J. & HITE, K.E. A study of enterotoxin and alpha and beta hemolysin production by certain *Staphylococcus* cultures. *J. infect. Dis.*, 76: 78-82, 1945.
148. TAKESHIGE, K. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. *Jap. J. vet.Sci.*, 45: 355-62, 1983.
149. TROLLER, J.A. & CHRISTIAN, J.H.B. *Water activity and food*. New York, Academic Press, 1978.
150. VICTOR, R. et al. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 18: 126-7, 1969.
151. VILLARROEL, M.S. Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararacussu*, *B. athrox* e *B. cotiara*), São Paulo, 1972. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
152. WADSWORTH, C. A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel. *Int. Arch. Allergy*, 10: 355-60, 1957.

153. WIENEKE, A.A. Enterotoxin production by strains of **Staphylococcus aureus** isolated from foods and human beings. **J. Hyg., London**, 73: 255-62, 1974.
154. WILLIAMS, R.E.O. Skin and nose carriage of bacteriophage types of **Staphylococcus aureus**. **J. Path. Bact.**, 58: 259-68, 1946.
155. WILLIAMS, R.E.O. & HARPER, G.J. Staphylococcal haemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth haemolysin. **J. Path. Bact.**, 59: 69-78, 1947.
156. WILLIAMS, R.E.O. et al. Bacteriophage typing of strains of **Staphylococcus aureus** from various sources. **Lancet**, 1: 510-4, 1953.
157. WILSON, D. Pesquisa de **Staphylococcus aureus** em leite a ser pasteurizado. **Rev. Saúde públ., S.Paulo**, 11: 1-11, 1977.
158. WILSON, G.S. & MILES, A.A. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 6.ed. London, Edward Arnold, 1975. p. 764-801.
159. WOOLPERT, O.C. & DACK, G.M. Relation of gastrointestinal poison to other toxic substances produced by staphylococci. **J. infect. Dis.**, 52: 6-19, 1933.
160. ZARZOUR, J.Y. & BELLE, E.A. Evaluation of three test

procedures for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical sources. *J. clin. Microbiol.*, 7: 133-6, 1978.

161. ZELANTE, F. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus* isolados de canais radiculares. São Paulo, 1974.
[Tese de Livre-Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
162. ZELANTE, F. et al. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16: 92-6, 1982.
163. ZELANTE, F. et al. Verificação de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* em portadores bucais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., São Paulo, 1983. Programa. Resumos. São Paulo, Associação Latino Americana de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983.
p. 270.

A N E X O 1

**TÉCNICAS DE PREPARO DAS SOLUÇÕES E DOS MEIOS DE
CULTURA, EMPREGADOS NO PRESENTE TRABALHO.**

1. ÁGUA FOSFATADA (JENSEN e cols⁹⁰, 1978).

Solução A (estoque):

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 34 g
 Água destilada 500 ml

O pH era ajustado em 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N e o volume completado a 1.000 ml com água destilada.

Solução B (estoque):

Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) .. 50 ml
 Água destilada q.s.p..... 1.000 ml

Ambas as soluções eram esterilizadas em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Solução de uso:

Solução A 1,25 ml
 Solução B 5 ml
 Água destilada q.s.p. 1.000 ml

2. ÁGAR BAIRD-PARKER (Merck art. nº 5.406)

Segundo a técnica recomendada pelo fabricante, a 58 g do meio desidratado eram adicionados 1.000 ml de água destilada, aquecendo-se a mistura até a ebulição, para a dissolução do meio. A seguir, o meio era esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos e em seguida, após resfriamento a 50°C, adicionavam-se 50 ml de uma emulsão de gema de ovo a 50% em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada

(BILLING & LUCKHURST¹⁹, 1957) e 3 ml de solução de telurito de potásio, esterilizada, a 3,5 g % em água destilada. O meio era distribuído em placas de Petri esterilizadas, as quais eram mantidas em geladeira a 4°C até o momento do uso.

3. ÁGAR SIMPLES (ICMSF⁸⁶, 1978)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	15,0 g

Esses componentes eram adicionados a 1.000 ml de água destilada e dissolvidos por aquecimento até a ebulição. O meio depois disso, resfriado a 50-60°C e com o pH ajustado em 7,0, era distribuído em volumes de 5 ml, em tubos de 16 x 160 mm, e esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos. A seguir, os tubos eram mantidos à temperatura ambiente em posição inclinada até a solidificação do ágar e conservados em geladeira a 4°C. Tal meio, era, também, distribuído em placas de Petri que, da mesma forma que os tubos, após a solidificação do ágar, eram mantidos a 4°C.

4. CALDO GLICOSADO A 1% (ICMSF⁸⁶, 1978)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Glicose	10,0 g

Adicionavam-se 1.000 ml de água destilada a

esses ingredientes e após sua dissolução ajustava-se o pH a 7,3.

A seguir, volumes de 10 ml do meio eram distribuídos em tubos de 16 x 160 mm e esterilizados em autoclave a 120°C por 15 minutos, sendo posteriormente conservados em geladeira a 4°C até a sua utilização.

5. ÁGAR CARBOIDRATO-PÚRPURA DE BROMOCRESOL (Subcomitê Internacional de Taxionomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus*¹⁴⁶, 1965).

Triptona	10,0	g
Extrato de levedura	1,0	g
Glicose, Manitol ou Maltose	10,0	g
Púrpura de Bromocresol	0,04	g
Ágar	2	g
Água destilada	1.000	ml

Todos os ingredientes, com exceção do carboidrato, eram dissolvidos em água destilada por aquecimento até a ebulição. Ajustava-se o pH em 7,0 e esterilizava-se o meio por autoclavação a 120°C por 15 minutos. A seguir o carboidrato, em solução a 20% e esterilizado em filtro Seitz, era adicionado, assepticamente, na proporção de 10 g/1.000 ml de meio fundido. A seguir, enquanto quente, o meio era distribuído, assepticamente, em tubos de 12 x 120 mm em volumes de 5 ml e após o seu resfriamento, na posição vertical, era conservado em geladeira a 4°C.

6. CALDO INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO (Difco B 37)

Seguindo-se as informações do fabricante, dissolviam-se, por aquecimento, 37 g do produto desidratado em 1.000 ml de água destilada, sendo o pH ajustado em 7,4. Em seguida o meio era distribuído em volumes de 10 ml em tubos de 16 x 160 mm e esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após o resfriamento este meio era mantido em geladeira a 4°C.

7. CALDO INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO EM CONCENTRAÇÃO DUPLA

No preparo deste meio utilizava-se a mesma técnica descrita no item 6, porém empregando-se quantidade dupla do meio desidratado.

8. PLASMA PARA A PROVA DE COAGULASE

Para a obtenção do sangue, utilizaram-se 3 coelhos*, mantidos em jejum por 24 horas, os quais eram submetidos à punção cardíaca e o sangue colocado em tubos de centrífuga de 15 ml contendo solução aquosa de citrato de sódio a 3,8% e mantendo-se a proporção de 10 ml de sangue para 2,5 ml do anticoagulante. Após a homogeneização, o sangue era centrifugado durante 20 minutos a 2.000 rpm e a seguir separava-se o plasma, o qual era conservado em geladeira a 4°C. Para a realização da prova da coagulase, o plasma era diluído a 1:5 em solução esterilizada de cloreto de sódio a 0,85 g % e distribuído em volumes de 0,5 ml em

*Gentilmente cedidos pela Drª JOANA AKIKO FURUTA, do Inst. Butantã.

tubos de ensaio de 10 x 70 mm (ZELANTE¹⁶¹, 1974).

O plasma bovino foi obtido de maneira semelhante ao de coelho, diferenciando-se apenas quanto á forma de obtenção do sangue, o qual foi colhido de 3 animais por punção da veia jugular. O plasma humano obtido em solução aquosa de citrato de sódio a 3,8 g% foi gentilmente cedido pelo Departamento de Metabolismo de Drogas e Farmacocinética do laboratório Laborterápica Bristol Química e Farmacêutica Ltda.

9. ÁGAR DNA - AZUL DE TOLUIDINA (LACHICA e cols⁹⁷, 1971)

Ácido desoxirribonucleico	0,03	g
Cloreto de cálcio (anidro)	0,00011	g
Cloreto de sódio	1,0	g
Solução aquosa de azul de toluidina a 1%	0,92	ml
Tris (hidroximetil) aminometana	0,61	g
Ágar	1,0	g

Em balão de Erlenmeyer de 250 ml esterilizado, dissolveu-se em 100 ml de água destilada o Tris (hidroximetil) aminometana ajustando-se o pH em 9,0. Adicionavam-se, a seguir, os demais ingredientes com exceção do azul de toluidina, aquecendo-se a mistura até a ebulição e a completa dissolução do DNA e do ágar. Em seguida, juntava-se a solução de azul de toluidina, tampava-se o balão com rolha de borracha estéril e o meio era mantido em geladeira a 4°C.

10. CALDO PARA A PROVA DE PRODUÇÃO DE ACETOÍNA (HARRIETTE & DUMOFF⁸⁰, 1974).

Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	5 g
Peptona	7 g
Dextrose	5 g
Água destilada	1.000 ml

Os componentes eram adicionados a água destilada e dissolvidos por aquecimento brando. Após o seu pH ter sido ajustado em 6,9 o meio era distribuído em tubos de 16 x 160 mm em volumes de 5 ml e esterilizados a 115°C por 10 minutos.

11. ÁGAR CRISTAL VIOLETA (MEYER¹¹¹, 1967)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	20,0 g
Solução aquosa de cristal violeta a 1%	1,0 ml

Esses ingredientes, com exceção da solução de cristal violeta, eram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada, sendo o meio, a seguir, esterilizado em autoclave a 110°C por 15 minutos. Após a esterilização, adicionava-se, assepticamente, 1 ml da solução aquosa de cristal violeta a 1% a 1.000 ml de meio fundido. A seguir o meio era distribuído em volumes de, aproximadamente, 10 ml em placas de Petri esterilizadas e após a solidificação ao ágar, mantido em geladeira a 4°C.

12. PLASMA EM ÁGAR SIMPLES (CHRISTIE & WILSON³⁶, 1941)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	20,0 g
Plasma de coelho em solução de citrato de sódio a 3,8% (Anexo 1, item 8)	120 ml

Os componentes do meio, com exceção do plasma, eram adicionados a 1.000 ml de água destilada e após a sua dissolução, procedia-se à esterilização em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após a esterilização o meio era resfriado a cerca de 50°C e adicionado de 120 ml do plasma. Essa mistura era mantida aquecida a 56°C por 15 minutos, a fim de precipitar o fibrinogênio e a seguir, distribuído em placas de Petri esterilizadas, as quais, após a solidificação do ágar eram mantidas a 4°C até o momento do uso.

13. ÁGAR INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO INCLINADO (Difco B 37)

De acordo com as instruções do fabricante, 52 g do meio de cultura desidratado eram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada, por ebulição, sendo o pH ajustado em 7,4. A seguir, o meio era distribuído em tubos de 16 x 160 mm em volumes de 5 ml e esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Posteriormente, os tubos eram retirados da autoclave, colocados em posição inclinada até a solidificação do ágar e, a seguir, mantidos em geladeira a 4°C.

14. SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA (0,02 M)**Solução A (estoque)**

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	2,84 g
Cloreto de sódio	8,50 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Solução B (estoque)

Fosfato monossódico ($\text{Na H}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$)	2,76 g
Cloreto de sódio	8,50 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

As duas soluções eram esterilizadas em auto
clave a 120°C por 15 minutos.

Solução de uso

Solução A	35,5 ml
Solução B	14,5 ml

As soluções A e B eram misturadas, asseptica
mente, e o pH ajustado, se necessário, em 7,3 por adição
das soluções A ou B, conforme o caso.

15. ÁGAR A 1% EM ÁGUA DESTILADA

A 100 ml de água destilada era adicionado
1,0 g de ágar (Difco) o qual era dissolvido por aquecimen-
to em banho-maria fervente, sob freqüente agitação seguido
de resfriamento. Os frascos, eram posteriormente mantidos
em temperatura ambiente.