

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OCORRÊNCIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ENTEROTOXIGÊNICO DE *Staphylococcus* ISOLADOS DE
DERIVADOS LÁCTEOS**

ISABELA MATEUS MARTINS

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciência de Alimentos.

PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA
Orientador

Campinas, SP
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

M366o Martins, Isabela Mateus
Ocorrência e avaliação do potencial enterotoxigênico de
Staphylococcus isolados de derivados lácteos / Isabela Mateus
Martins. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: José Luiz Pereira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Staphylococcus*. 2. Derivados lácteos. 3. Enterotoxinas. 4.
Perfil fenotípico. 5. Perfil genotípico. I. Pereira, José Luiz. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Occurrence and assessment of enterotoxigenic potencia of
Staphylococcus isolated from dairy products

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Staphylococcus*, Dairy products, Enterotoxins,
Phenotypic profile, Genotypic profile

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: José Luiz Pereira

Dirce Yorika Kabuki

Maria de Fatima Borges

Data da Defesa: 28/02/2011

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação:

**OCORRÊNCIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE
Staphylococcus ISOLADOS DE DERIVADOS LÁCTEOS**

Defendida em ____/____/____ por **ISABELA MATEUS MARTINS** e aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Orientador)

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki
(Membro)

Dra. Maria de Fatima Borges
(Membro)

Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper
(Membro)

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro)

*À minha querida mãe Emeli, por
ser minha grande incentivadora, pelos
ensinamentos valiosos, pela ótima
educação que recebi e por sempre
acreditar em mim, ao meu pai
Mazinho, pela força, confiança,
carinho e amor, ao meu irmão Miguel
e minha cunhada Marli, pela
preocupação e grande auxílio quando
muito precisei e à minha irmã Ana
Maria pelo companheirismo, amizade,
apoio e incentivo em todos os
momentos.*

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pela orientação e confiança na realização desse trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki e Dra. Maria de Fatima Borges pelas valiosas sugestões e correções da dissertação;

Aos meus pais, Emeli e Valdemar, por serem os responsáveis por minha vida e todas as minhas conquistas até hoje, pelo amor, carinho e confiança de sempre;

À minha mãe por ser minha grande amiga e meu porto seguro de força, calma e paciência;

Aos meus irmãos Ana e Miguel e à minha cunhada Marli pelo incentivo, preocupação, pelas dicas e ajudas, pela amizade, companheirismo em diversos momentos e por serem incríveis profissionais a serem tomados como exemplo para minha vida;

Ao Marcelo pelos “puxões de orelha”, pela preocupação, pelo incentivo, por sempre confiar em mim, por estar ao meu lado e me aguentar nos momentos de chatice, estresse, indecisão, medo, ansiedade, etc., por me ajudar muito com as apresentações e com os gráficos, pelo amor, carinho e compreensão;

À Prof. Dra. Dirce Yorika Kabuki, por ter me dado um voto tão grande de confiança, por me ensinar grande parte do que sei de Microbiologia de Alimentos e de Biologia Molecular, por estar presente em todos os momentos desde que cheguei a Campinas, por ter paciência, por aturar meu jeito “doido”, pela amizade acima de tudo, pelas conversas, preocupações, risadas, apoio durante o bacharelado e todo o mestrado, por ser minha principal professora e um grande exemplo a ser seguido;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela confiança e orientação durante meu início no “mundo da pesquisa”;

À Dona Norma Teruko Nago Miya, pelos conselhos, pela ajuda, pelas boas conversas, incentivo, confiança, ensinamentos, paciência, grande apoio e amizade durante minha passagem pelo Laboratório de Toxinas Microbianas;

À Dona Laura, pelo companheirismo no dia a dia laboratorial, pela enorme ajuda com as vidrarias, pela amizade e por ser um exemplo de força e luta na vida;

Às amigas de convívio no Laboratório de Higiene Luciana, Vanessa, Pamela, Luciene, Raquel, Graci, Marcília, Meg, Marisa, Maria Amélia e Ana, pessoas

incríveis que passaram por minha vida e me ensinaram muitas coisas, foram companheiras, queridas, prestativas e, acima de tudo, amigas;

À Lu Esper, por ter um coração tão bonito e caridoso, por ser um ser humano incrível e ter sido mais do que amiga em tantos momentos em que precisei. Obrigada por ter sido meu “anjo da guarda” em Campinas;

Às amigas-irmãs de Botucatu, Cosme e Promoção, que mesmo estando cada uma em uma cidade diferente neste momento, continuam presentes em minha vida, que deixaram as melhores lembranças e que espero que essa amizade permaneça viva para sempre!

Ao grande amigo Aparecido (Maca), por ter me ajudado sempre, especialmente no início quando não tinha onde ficar em Campinas, por ser um grande amigo, pelas risadas, pelos barzinhos da vida, pelos “probleminhas” que tivemos juntos no mestrado, pela ajuda com as aulas e atribuições do Estado e pelas várias tentativas de me ajudar a arrumar um emprego!

Aos amigos dos laboratórios vizinhos do DCA: Renan, Poli, Vivi, Fer, Bruno, Polly, Dani bio, Zé, Fabiano, Ana Luíza, Gustavo, Cris e Beth, pelos bons momentos que passamos juntos;

Aos queridos amigos do PED Rafael e Alê pelo convívio, apoio, ensinamentos, trocas de experiências e amizade, e em especial à Alê pela ajuda com a qualificação e com a dissertação;

Às amigas de república Bela e Carla pelo convívio durante este ano, pela amizade conquistada, pelo apoio, pela paciência nos meus dias de estresse e por aguentarem e escutarem minhas reclamações frequentes; em especial à Bela pelas correções no inglês;

Ao Batata pela amizade e bom humor de sempre, confiança e competência pela nossa vitória no concurso de Jingles, um marco importante durante esta fase de minha vida;

Às minhas grandes e amadas amigas gaúchas Aninha, Franzinha e Vivi por terem me salvado do momento “sem amigos”, por me aturarem, pelos inúmeros momentos de alegria, descontração, pelas risadas, pelos almoços, festinhas, carnavais, pelo suporte em momentos difíceis, pelo incentivo com o mestrado, por confiarem em mim e pela grande amizade que levarei por toda a vida! Tenho muita sorte de ter conhecido vocês!

À Fundação Oswaldo Cruz pelas cepas de referência concedidas tão prontamente;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida;

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade para realização deste trabalho;

Acima de tudo agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e força a mim proporcionada para vencer dificuldades e conseguir finalizar este trabalho!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xvi
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leite e derivados: importância, consumo e microbiota associada	4
2.2. O gênero <i>Staphylococcus</i>	10
2.3. <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos e suas características de patogenicidade	15
2.4. Intoxicação alimentar estafilocócica	21
2.5. Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> e suas enterotoxinas em leite e derivados	30
2.6. Métodos para detecção de <i>Staphylococcus</i> e suas enterotoxinas em alimentos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. Amostragem	43
3.2. Análises Microbiológicas	43

3.2.1. Abertura asséptica e preparo das amostras	43
3.2.2. Contagem, isolamento e identificação fenotípica de <i>Staphylococcus</i> .	44
3.2.2.1. Coloração de Gram	44
3.2.2.2. Teste de catalase	45
3.2.2.3. Teste de coagulase	47
3.2.2.4. Teste de DNase	47
3.2.2.5. Teste de susceptibilidade à Furazolidona	48
3.3. Análises complementares	48
3.3.1. Identificação fenotípica de espécies isoladas	48
3.3.2. Avaliação de características de patogenicidade	49
3.3.2.1. Avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas	49
3.3.2.2. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas	50
3.3.2.2.1. Extração de DNA	50
3.3.2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase – <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR)	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa e <i>Micrococcus</i> sp. nos alimentos	53
4.2. Análises complementares	64
4.2.1. Identificação fenotípica de espécies	64

4.2.2. Avaliação de características de patogenicidade	72
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Composição nutricional de derivados do leite (porção de 100g)	6
Tabela 2.	Recomendação para ingestão diária de cálcio nas diferentes faixas etárias	7
Tabela 3.	Espécies e subespécies do gênero <i>Staphylococcus</i>	13
Tabela 4.	Parâmetros importantes para o desenvolvimento de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas em alimentos	17
Tabela 5.	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa produtores de enterotoxinas <i>in vitro</i>	18
Tabela 6.	Diferentes enterotoxinas e suas variações produzidas por <i>Staphylococcus</i>	20
Tabela 7.	Surtos de intoxicação estafilocócica relacionados à ingestão de derivados lácteos no Brasil (1993-2002)	26
Tabela 8.	Surtos de intoxicação estafilocócica relacionados à ingestão de derivados lácteos em países da América Latina (1993-2002)	28
Tabela 9.	Métodos imunológicos rápidos para detecção de enterotoxinas clássicas	39
Tabela 10.	Culturas de referência utilizadas como controles positivos para detecção de enterotoxinas e genes codificadores	51
Tabela 11.	Sequências de oligonucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados durante reação de PCR	52

Tabela 12.	Contagem preliminar média de população de <i>Staphylococcus</i> presente nas amostras analisadas	53
Tabela 13.	Frequência de amostras de derivados lácteos contaminadas por <i>Staphylococcus</i> e <i>Micrococcus</i>	56
Tabela 14.	Contagem média de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e negativa e <i>Micrococcus</i> em produtos derivados do leite	59
Tabela 15.	Variações das contagens de <i>Staphylococcus</i> nos produtos lácteos analisados	61
Tabela 16.	Frequência de amostras com contagens acima dos limites estabelecidos pela RDC 12/2001 para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	62
Tabela 17.	Número de isolados e suas respectivas espécies identificadas com clareza através do <i>kit API-Staph</i> (bioMérieux)	68
Tabela 18.	Perfis de coagulase e DNase com relação às espécies de <i>Staphylococcus</i> identificadas	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Consumo brasileiro de leite pasteurizado (1990 a 2004)	8
Figura 2. Evolução da produção de leite no Brasil no período de 1996 a 2008	8
Figura 3. Principais estados produtores de leite em 2009	9
Figura 4. Microscopia óptica de esfregaço de <i>Staphylococcus</i> sp. (coloração de Gram)	12
Figura 5. Surtos de DTA e números de doentes no Brasil (1999-2008)	24
Figura 6. Surtos de DTA por agente etiológico ocorridos no Brasil no período de 1999 a 2008	24
Figura 7. Surtos de DTA por tipo de alimento contaminado ocorridos no Brasil no período de 1999-2008	25
Figura 8. Sistema <i>API-Staph</i> (bioMérieux)	37
Figura 9. Representação esquemática do método ELFA, para detecção de enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> , realizado através do aparelho Mini VIDAS (bioMérieux)	41
Figura 10. Diferenciação entre colônias típicas e atípicas de <i>Staphylococcus</i> (crescimento em meio Baird Parker)	45
Figura 11. Procedimento de contagem e caracterização de <i>Staphylococcus</i> em alimentos	46
Figura 12. Reação do teste de coagulase para <i>Staphylococcus</i>	47
Figura 13. Porcentagem de <i>Micrococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase	55

positiva e negativa isolados de derivados do leite

Figura 14.	Distribuição de amostras de produtos derivados do leite conforme faixa de contagem de <i>Staphylococcus</i>	61
Figura 15.	Frequência de espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> isoladas em produtos derivados do leite	65
Figura 16.	Frequência de espécies de <i>Staphylocccus</i> por alimento analisado	66
Figura 17.	Relação entre colônias típicas e atípicas, coagulase positivas e negativas isoladas em meio BP, a partir de produtos derivados do leite	71
Figura 18.	Produtos de amplificação dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> nas cepas de referência de <i>S. aureus</i> através da técnica de PCR	73

RESUMO

Staphylococcus são micro-organismos amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais suas principais fontes. A contaminação cruzada após a pasteurização do leite, especialmente por manipulação inadequada, é apontada como a mais importante forma de contaminação dos derivados do leite por estes patógenos, que são importantes em alimentos devido à sua habilidade de produzir uma grande quantidade de proteínas extracelulares (enterotoxinas) que, se pré-formadas no alimento e ingeridas, causam a intoxicação estafilocócica. Apesar da legislação brasileira (RDC 12/2001, Anvisa) preconizar apenas a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, relacionando a produção da coagulase com o risco de produção de enterotoxinas, já foi comprovado que espécies coagulase negativas também são capazes de produzir enterotoxinas nos alimentos. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: i) quantificar e analisar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa em 104 amostras de derivados lácteos, sendo 24 de sorvete artesanal, 20 de creme de leite pasteurizado, 20 de patê à base de queijo, 20 de queijo Minas frescal e 20 de queijo Minas meia cura; ii) identificar fenotipicamente as espécies isoladas; iii) avaliar a produção de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE) *in vitro* pelo sistema VIDAS e relacionar os resultados obtidos com a presença de possíveis genes codificadores destas enterotoxinas, pela aplicação da técnica de PCR. Os valores médios de contagens preliminares nos diferentes grupos de alimentos analisados foram: 5×10^3 UFC/g em sorvete, $2,9 \times 10^5$ UFC/g em creme de leite, $6,2 \times 10^3$ UFC/g em patê, $6,6 \times 10^5$ UFC/g em queijo Minas frescal e $6,4 \times 10^5$ UFC/g em queijo Minas meia cura. Do total de isolados, 83,6% (148/177) foram classificados como sendo do gênero *Staphylococcus* e 16,4% (29/177) como *Micrococcus*. *Staphylococcus* foram isolados de 43,3% (45/104) das amostras, sendo detectados em 25 amostras de queijos, em 16 sorvetes, em 3 patês e em apenas 1 amostra de creme de leite. Entre os isolados de *Staphylococcus*, 74,3% (110/148) eram coagulase negativa e 25,7% (38/148)

eram coagulase positiva recuperados apenas nas amostras de queijos. Dos 111 isolados selecionados (27 coagulase positiva e 84 coagulase negativa), foram identificadas 13 espécies através do sistema *API-Staph* (bioMérieux-SA): *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii ssp cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*. Para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, foi utilizado o *kit* imunoenzimático ViDAS SET “Staph enterotoxin” (bioMérieux-SA). Dos 111 isolados, apenas um (0,9%) produziu enterotoxina, sendo este identificado como *S. aureus*, coagulase positiva, isolado a partir de queijo Minas meia cura, cuja contagem foi de $1,9 \times 10^6$ UFC/g. Ao contrário do esperado, não foram detectados genes codificadores das 5 enterotoxinas em nenhum dos isolados analisados. Discrepâncias entre resultados de testes fenotípicos e genotípicos para detecção de enterotoxinas são comuns, sendo necessária a realização de outros testes imunológicos e moleculares para confirmação destes resultados. Possíveis justificativas seriam a existência de variações nas sequências dos genes do isolado ou a presença de uma toxina que possui reação imunológica cruzada com as enterotoxinas clássicas. Neste estudo, apesar da quase totalidade dos isolados não terem produzido enterotoxinas clássicas, havia um número bem elevado de *Staphylococcus* em diversos produtos analisados, não excluindo um possível risco de produção das demais enterotoxinas já descritas e demonstrando a falta de cuidados higiênico-sanitários e de boas práticas durante a produção e comercialização destes alimentos.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Derivados lácteos, Enterotoxinas clássicas, Perfil fenotípico, Perfil genotípico.

SUMMARY

Staphylococcus are microorganisms widespread in nature and humans and animals are their main sources. Cross-contamination after milk pasteurization, caused especially by improper handling, is considered the most recurrent source of dairy products contamination by these pathogens. *Staphylococcus* deserves our close attention due their ability to produce a large amount of extracellular proteins (enterotoxins), that if preformed in food and ingested, cause staphylococcal food poisoning. Although the Brazilian legislation (RDC 12/2001, Anvisa) only recommends coagulase-positive staphylococci count monitoring (relating coagulase production to the risk of enterotoxins production), previous researches showed that coagulase-negative species are also capable of producing enterotoxins in foods. Thus, this research aimed: i) to quantify and analyze the presence of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci from 104 dairy products samples, being: 24 homemade ice cream, 20 pasteurized dairy cream, 20 cheese pate, 20 Minas fresh cheese, and 20 Minas half cured cheese; ii) to identify phenotypically the species; iii) to evaluate the production of classic enterotoxins (SEA, SEB, Sec1, 2.3, SED and SEE) *in vitro* by using VIDAS system and correlate the results to the presence of possible coding genes of these enterotoxins, applying the PCR technique. The average staphylococcal preliminary count values in different food groups analyzed were: 5×10^3 CFU/g in ice cream, $2,9 \times 10^5$ CFU/g in dairy cream, $6,2 \times 10^3$ CFU/g in pate, $6,6 \times 10^5$ CFU/g in Minas fresh cheese and $6,4 \times 10^5$ CFU/g in Minas half cured cheese. From isolated strains, 83,6% (148/177) were classified as genus *Staphylococcus* and 16,4% (29/177) as *Micrococcus*. *Staphylococcus* were isolated from 43,3% (45/104) of samples, being found in 25 cheese samples, in 16 ice creams, in 3 pates and in just one dairy cream sample. Among staphylococcal strains, 74,3% (110/148) were coagulase-negative *Staphylococcus* and 25,7% (38/148) were coagulase-positive *Staphylococcus*, being these recovered only from cheeses samples. On 111 selected isolates (27 coagulase-positive and 84 coagulase-negative), were

identified 13 staphylococcal species by using *API-Staph* system (bioMérieux-SA): *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii ssp cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*. For classical staphylococcal enterotoxins detection was used VIDAS SET Staph-Enterotoxin immunoassay *kit* (bioMérieux-SA). From 111 isolates, just one (0,9%) produced enterotoxin, which was identified as *S. aureus*, coagulase-positive, isolated from Minas half cured cheese, whose count was $1,9 \times 10^6$ CFU/g. Contrary to expectations, no coding genes were present in isolates analyzed. Discrepancies between phenotypic and genotypic results of enterotoxin detection tests are common, requiring the application of other immunological and molecular tests for the confirmation of the results. Possible explanations would be that there are genes sequences variations or another enterotoxin that has immunological cross-reaction with classic enterotoxins. For this research, although the higher number of the isolates did not produce classical enterotoxins, the analyzed samples showed high staphylococcal concentration, that do not exclude a newly described enterotoxins risk production. It also demonstrates the lack of hygiene, health care and good practices during the production and commercialization of dairy products.

Keywords: *Staphylococcus*, Dairy products, Classic enterotoxins, Phenotypic profile, Genotypic profile.

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus são micro-organismos amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios (BANNERMAN, 2003). Em geral, as espécies deste gênero têm uma relação simbiótica com o hospedeiro, porém, por serem bactérias oportunistas, certas espécies são agentes etiológicos de várias infecções e intoxicações em humanos e nos animais, como as infecções agudas, septicemia, toxemias, síndrome do choque tóxico e gastroenterite estafilocócica (BAIRD-PARKER, 1990; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Geralmente, são encontrados nos pelos, na pele e mucosas, como boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal destes hospedeiros, porém, são também isolados a partir de diversas fontes de alimentos como carnes, queijos e leite, e também a partir de fontes ambientais como solo, areia, ar e água (KLOOS; SCHLEIFER, 1986; BANNERMAN, 2003).

A gastroenterite ou intoxicação estafilocócica é comumente definida como doença causada pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos (BENNETT, 1996). Os sintomas desta enfermidade incluem náuseas, vômitos, dor abdominal e eventual diarreia (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Entre os principais alimentos já relacionados a estes surtos destacam-se o leite cru, o leite pasteurizado, os queijos, além dos alimentos que são muito manipulados, sendo *S. aureus* a espécie mais frequentemente associada à produção de enterotoxinas (DE BUYSER *et al.*, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

A produção de enzima coagulase (responsável por coagulação de plasma sanguíneo humano ou de animais) e enzima nuclease termorresistente (termonuclease) é utilizada como indicador de patogenicidade e de possível enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* isolados de alimentos (BENNETT, 1996). No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos estabelecidos através da RDC N°12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina

limites apenas para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2001), indicando riscos a apenas este grupo de bactérias. As pesquisas, porém, têm demonstrado a capacidade de *Staphylococcus* não produtores de coagulase em produzirem enterotoxinas em meio de cultivo laboratorial (VERAS *et al.*, 2008; ZELL *et al.*, 2008; AL-TARAZI; ALBETAR; ALABOUDI, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010) e há, inclusive, registros de surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies não produtoras da enzima (OMORI; KATO, 1959; BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; CARMO *et al.*, 2002).

Mais de 40 espécies de *Staphylococcus* já são conhecidas e muitas delas são produtoras de enterotoxinas (DABROWSKI; SIKORSKI, 2005). Já foram descritos mais de 20 tipos de enterotoxinas distintas produzidas por estes patógenos, porém as “clássicas” (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE) são consideradas as de maior ocorrência (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

No leite cru, a principal fonte de contaminação é atribuída à mastite bovina, inflamação nas glândulas mamárias causadas por infecção, na qual espécies de *Staphylococcus* são os principais agentes etiológicos (ADAMS; MOSS, 2000). A contaminação cruzada pós-pasteurização, o processo de manipulação na produção, uso de equipamentos, abuso de temperatura durante transporte e estocagem são os principais fatores que levam ao crescimento de micro-organismos patogênicos em alimentos (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Atualmente, já está bem elucidado que, com relação à intoxicação alimentar estafilocócica, a principal fonte de contaminação de alimentos são os manipuladores, relacionada ao fato de 30 a 50% da população ser portadora de *S. aureus* na pele e mucosas, sendo de extrema importância a necessidade de cuidados de higiene e treinamento adequado destes profissionais, para obtenção de um produto final seguro (BERGDOLL, 1989; GERMANO; GERMANO, 2001).

Casos de intoxicação alimentar estafilocócica são frequentes, mas em sua grande maioria, não são notificados aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que leva a uma subnotificação desta doença no Brasil e em outros países. Trata-se de uma doença de curso rápido (24-48h), desta forma as pessoas afetadas normalmente não procuram atendimento médico.

Para a detecção de enterotoxinas, estudos sobre novas metodologias levaram ao desenvolvimento de técnicas imunológicas sensíveis e rápidas como *ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), LA (Látex agglutination), RPLA (*Reversed passive latex agglutination*) e *ELFA* (*Enzyme linked Fluorescent Assay*) (BRETT, 1998). Os métodos moleculares para caracterização de micro-organismos e características de patogenicidade, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) e em métodos de “fingerprinting” como eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE) e ribotipagem têm demonstrado serem ferramentas importantes em investigações epidemiológicas. Esses métodos permitem elucidar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), diagnosticar a contaminação microbiana ambiental em alimentos e nas indústrias e caracterizar o potencial patogênico de cepas isoladas de alimentos e do ambiente (STRUELENS, 1998).

A frequente detecção de *Staphylococcus* enterotoxigênicos a partir de leite e derivados sugere que a ingestão destes produtos está muito relacionada a problemas de saúde pública, tornando-se de real importância o incremento de estudos de identificação da produção de enterotoxinas, tanto a partir de espécies coagulase positivas quanto de coagulase negativas. São necessárias maiores investigações quanto aos riscos relacionados aos possíveis perigos microbiológicos na produção de leite e derivados, para garantir e estabelecer melhores níveis de segurança destes alimentos, já que o leite representa a principal fonte de cálcio para a população brasileira.

Este trabalho teve como objetivos avaliar o perfil de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa em produtos derivados do leite; identificar fenotipicamente as espécies isoladas através de testes bioquímicos; avaliar o potencial enterotoxigênico dos isolados através da detecção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE em meio de cultura laboratorial (*in vitro*) e da presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas comparando os resultados dos dois perfis (genotípico e fenotípico), observando concordâncias e discrepâncias entre eles.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite e derivados: importância, consumo e microbiota associada

O leite é considerado um alimento saudável e o consumo de derivados do leite está associado a uma dieta de qualidade. O leite oferece uma matriz rica em uma ampla variedade de nutrientes essenciais, como minerais, vitaminas, carboidratos e proteínas facilmente digeridas, com perfil balanceado de aminoácidos importantes para dar suporte às funções gerais do organismo (MILLER; JARVIS; McBEAN, 2000).

As proteínas do leite são completas, propiciando a formação e manutenção dos tecidos, sendo que a caseína representa 80-85% do total de proteínas. Seu principal carboidrato é a lactose, porém também apresenta pequenas porções de glicose e ácido cítrico. A quantidade de gordura no leite varia de 3,5 a 5%, existindo também pequenas quantidades de fosfolipídeos e diglicerídios. Além da vitamina A, o leite contém vitaminas do complexo B e minerais que favorecem o crescimento e à manutenção de uma vida saudável. Seu conteúdo de minerais é de aproximadamente 0,72%, apresentando alta quantidade de cálcio e baixa quantidade de ferro. O leite contém boa quantidade de fósforo, que também ajuda na formação dos ossos (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; EMBRAPA, 2008).

Quantidades adequadas de leite e derivados são necessárias durante o ciclo de vida para promover qualidade óssea, ajudar a reduzir o risco de doenças crônicas como a osteoporose, hipertensão e câncer, além de contribuir com uma grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável, representando o alimento natural com maior concentração de cálcio, essencial para a formação e manutenção dos ossos e dentes (EMBRAPA, 2008; MILLER; JARVIS; McBEAN, 2000). A manutenção da saúde óssea ao longo do curso da vida é garantida pelo consumo adequado de cálcio e outros

nutrientes, associado à exposição das pessoas aos raios solares, o que auxilia o organismo a produzir vitamina D, e à prática regular de atividade física (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Estudos provam que o consumo diário de leite e derivados reduz a incidência de osteoporose e previne doenças nutricionais como o escorbuto e o raquitismo (CHALLA *et al.*, 2003; CASHMAN, 2006). Da metade do século XX até o momento, pesquisas começaram a revelar que há possivelmente mais benefícios adquiridos com a alimentação de leite e derivados do que apenas a manutenção da saúde óssea em crianças. Descobriu-se que, além de ser a maior fonte de cálcio da dieta ocidental, o consumo regular de leite e derivados, dentro de um contexto de uma dieta balanceada, diminui o risco de desenvolvimento de hipertensão, cálculo renal, diabetes tipo 2, gota, câncer de cólon e doenças do coração (MACDONALD, 2008). Dois copos de leite já atendem a quase toda a recomendação de ingestão diária, por exemplo, de manganês, nutriente importante no aproveitamento das gorduras e no funcionamento do cérebro (EMBRAPA, 2008). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2009) recomenda de duas a três porções diárias de alimentos derivados do leite. As composições nutricionais do leite e alguns derivados estão apresentadas na **Tabela 1**.

Segundo as recomendações do Ministério da Saúde, o consumo de leite, na forma fluida ou de derivados, varia de acordo com a idade das pessoas. A recomendação para crianças de até dez anos é de 400 mL/dia, isto é, 146 litros/ano de leite fluido ou equivalente na forma de derivados. Para os jovens de 11 a 19 anos, o consumo deve ser maior, de 700 mL/dia ou 256 litros/ano e para os adultos acima de 20 anos a recomendação é de 600 mL/dia ou 219 litros/ano, inclusive para os idosos, porém o consumo para esse grupo de pessoas deve ser principalmente o tipo desnatado (EMBRAPA, 2008), por ser rico em cálcio e conter baixo teor de gordura. Os derivados do leite, como o iogurte e o queijo branco, têm o mesmo perfil nutricional do leite, exceto a manteiga e o creme de leite que são constituídos praticamente de gordura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A

recomendação para ingestão de cálcio, por faixas de idade, está apresentada na **Tabela 2.**

Tabela 1. Composição nutricional de derivados do leite (porção de 100g).

Composição	Leite de vaca integral	Creme de leite	Sorvete	Queijo branco
Energia (kcal)	66	381	177	381
Proteína (g)	3,3	2,0	3,6	23,7
Carboidrato (g)	4,6	2,7	19,8	0,1
Gordura (g)	3,9	40,3	9,8	31,8
Vitamina A (µg)	30	399	91	351
Vitamina B1(mg)	0,03	0,02	0,1	0,02
Vitamina B2 (mg)	0,23	0,17	0,28	0,46
Vitamina B3 (mg)	0,2	traços	0,2	0,1
Vitamina B5 (mg)	0,58	0,22	1,05	0,29
Vitamina B6 (mg)	0,06	0,04	0,04	0,08
Vitamina B12 (µg)	0,9	0,2	0,5	1,6
Biotina (µg)	2,5	1,4	2,2	3,9
Vitamina C (mg)	2,0	1,0	1,0	traços
Vitamina D (µg)	Traços	0,3	0,5	0,2
Sódio (mg)	43	25	60	502
Potássio (mg)	155	86	174	82
Cálcio (mg)	118	58	100	544
Magnésio (mg)	11	6	12	22
Fósforo (mg)	93	59	91	408
Ferro (mg)	0,03	traços	traços	0,3

Fonte: The Dairy Council, 2010.

O simples consumo de três porções de produtos lácteos por dia é algo que deveria, se possível, ser seguido por todos (MACDOLNALD, 2008), pois com o atendimento desta recomendação, haveria uma possível redução de custos com

saúde pública pela prevenção de doenças nutricionais e ósseas, porém o impacto positivo na qualidade de vida das pessoas seria ainda mais expressivo.

Tabela 2. Recomendação para ingestão diária de cálcio nas diferentes faixas etárias.

Idade	Quantidade (mg/dia)
Crianças de 1 a 3 anos	800
Crianças de 4 a 8 anos	800
Pré-adolescentes e adolescentes de 9 a 18 anos	1200 – 1500
Adultos	1000 – 1200

Fonte: "Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics" (1999).

O leite foi o principal produto de origem animal analisado pela Pesquisa de Produção da Pecuária Municipal (IBGE, 2008). Em 2008 foram produzidos 27.579 bilhões de litros do produto, estabelecendo um aumento de 5,5% sobre o volume registrado em 2007. O consumo interno *per capita* de leite ficou em torno de 146 litros (IBGE, 2008). As evoluções do consumo e da produção brasileira de leite estão apresentados nas **Figuras 1 e 2**.

Nota-se a produção continuamente crescente, em todos os anos da série. A Região Sul do País teve aumento de produção de 10,1%, alavancado pelos incrementos em Santa Catarina (14,0%) e do Rio Grande do Sul (12,6%). O Centro-Oeste teve aumento de 6,5%, tendo o principal incremento ocorrido em Goiás (8,9%). A principal variação positiva geral aconteceu no Estado do Amazonas (101,9%), enquanto a principal queda ocorreu no Distrito Federal (-18,6%), segundo o IBGE (2008). Os principais estados produtores de leite durante o ano de 2009 são apresentados na **Figura 3** (IICA, 2009).

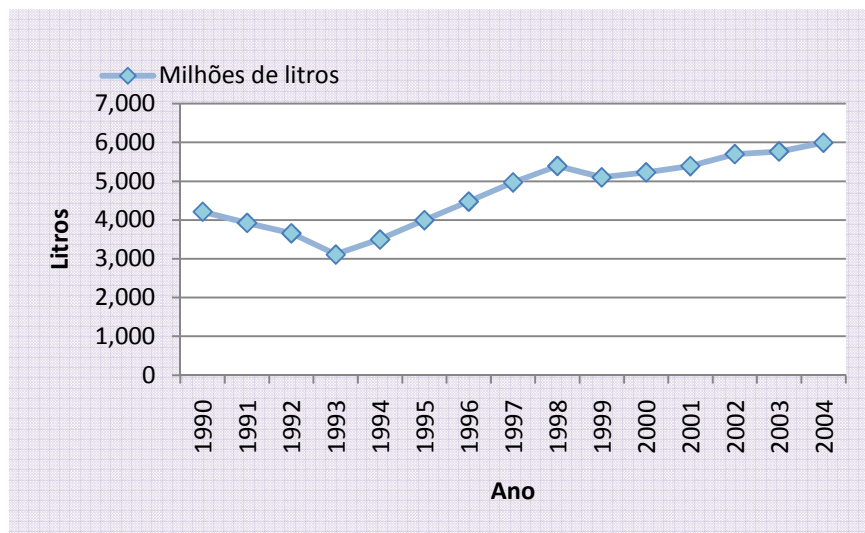


Figura 1. Consumo brasileiro de leite pasteurizado (1990 a 2004).

Fonte: Leite Brasil.

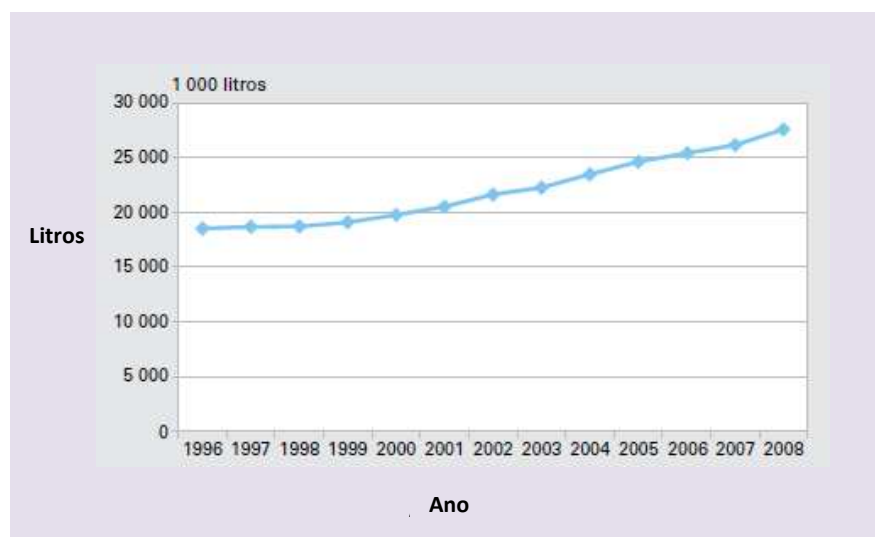


Figura 2. Evolução da produção de leite no Brasil no período de 1996 a 2008.

Fonte: IBGE, 2008.

A microbiologia do leite possui grande influência na produção e consumo de derivados lácteos. Por ser um alimento rico em carboidratos, proteínas e lipídeos, apresentar um pH próximo da neutralidade e uma elevada atividade de água, o leite bovino fluido é um ótimo meio para o desenvolvimento

de diversos micro-organismos, o que o caracteriza como um alimento muito perecível (ADAMS; MOSS, 2000).

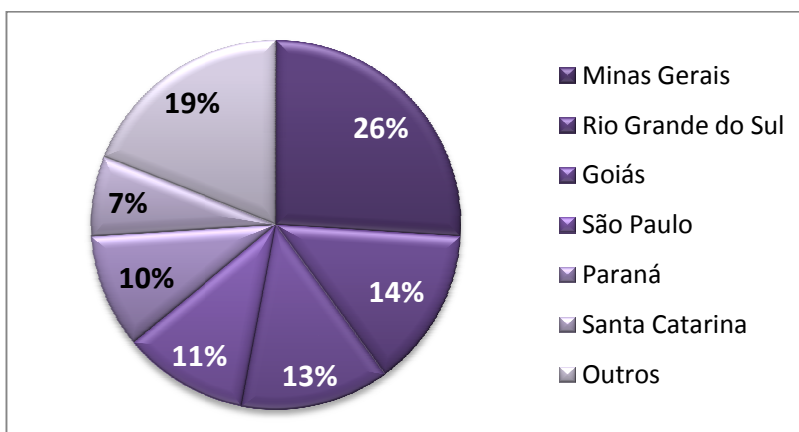


Figura 3. Principais estados produtores de leite em 2009.

Fonte: IICA, 2009 (modificado).

O leite que é extraído de uma vaca saudável deveria ser livre de micro-organismos, porém a mucosa do canal da mama do animal normalmente possui um nível de contaminação proveniente do meio externo, que varia de 10^2 a 10^4 UFC/mL de leite (ICMSF, 1998).

O leite cru possui uma microbiota muito variada, que pode ser proveniente do interior da mama (saudável ou com infecções), do meio ambiente onde o animal se encontra e dos ordenhadores e equipamentos que entram em contato com o animal e com o leite (ICMSF, 1998). Esta microbiota pode incluir uma diversidade de bactérias deterioradoras e patogênicas, como as psicrotróficas, que podem se multiplicar a 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, as termodúricas, que podem sobreviver ao tratamento térmico da pasteurização, as lácticas, que acidificam rapidamente o leite cru não-refrigerado, os coliformes, bactérias formadoras de esporos, patógenos que causam mastite e diversos fungos e leveduras (HAYES; BOOR, 2001).

Desordens metabólicas no gado leiteiro, erros na manipulação durante a ordenha, transporte e armazenamento, além de inflamações nas glândulas mamárias, como a mastite, podem causar defeitos sensoriais, químicos e físicos no leite, levando a modificações em sua composição (ICMSF, 1998).

Os micro-organismos patogênicos e deterioradores podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e conseqüentemente os produtos derivados do leite, os quais podem sofrer contaminação durante processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (NOUT, 1994; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A ação das bactérias ou de suas enzimas sobre os componentes lácteos causa várias alterações no leite e seus derivados, modificando a composição, gerando atributos sensoriais negativos e diminuindo a vida de prateleira. Além disso, há diversos patógenos associados com esses alimentos, que podem influenciar diretamente na saúde de seus consumidores (HAYES; BOOR, 2001), tornando o alimento fonte de diversas doenças, como a brucelose, salmonelose, campilobacteriose, colite entero-hemorrágica, antrax, listeriose, doença de Crohn, além das mastites estafilocócicas e estreptocócicas (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

2.2. O gênero *Staphylococcus*

Na primeira edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (KLOOS; SCHLEIFER, 1986), o gênero *Staphylococcus* pertencia à família *Micrococcaceae*, juntamente com os gêneros *Micrococcus*, *Planococcus* e *Stomatococcus*, porém, já era conhecido que estes gêneros não estavam relacionados de acordo com conceitos filogenéticos. Foi somente na última década, com o avanço de técnicas de biologia molecular e estudos genéticos, da diferença de conteúdo de G+C nos DNAs, suas diferentes composições de parede celular, estudos de hibridização de ácidos nucleicos, de perfis de ácidos graxos e

estudos com análises comparativas entre sequências de RNA ribossômico 16S, que a taxonomia e filogenia do gênero foram revistas (GARRITY; HOLT, 2001; PEREIRA, 2006).

Desta forma, na segunda edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (GARRITY; HOLT, 2001), a família *Micrococcaceae* apresenta as espécies *Micrococcus*, *Kocuria* e *Stomatococcus*. O gênero *Staphylococcus* foi incluído em uma nova família: *Staphylococcaceae*. Esta família apresenta os gêneros *Staphylococcus*, *Gamella*, *Macrococcus* e *Salicinococcus*. Além disso, *Staphylococcaceae* é inserida à ordem *Bacillales* bem como a família *Bacillaceae*, demonstrando que *Staphylococcus* apresentam proximidade genética com bactérias do gênero *Bacillus* (GARRITY; HOLT, 2001).

O gênero *Staphylococcus* passou a pertencer ao Filo Firmicutes, bactérias com forma de cocos ou bastonetes, cuja maioria são Gram positivas, exceto algumas com ausência de parede celular (*Mycoplasma*) e outras que possuem uma pseudomembrana porosa que as torna Gram negativas. Este grupo é denominado grupo de conteúdo baixo de GC em seu DNA, em contraposição com as Actinobactérias, que possuem conteúdo alto de GC (GARRITY; HOLT, 2001).

Staphylococcus é morfologicamente similar ao gênero *Micrococcus*, porém podem crescer anaerobicamente, demonstram ter metabolismo anaeróbico facultativo e são sensíveis à lisostafina e furazolidona, em contraste ao metabolismo estritamente aeróbico dos *Micrococcus* e sua resistência aos compostos citados (VON RHEINBACH; HADLOCK, 1981; ICMSF, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são caracterizadas como cocos Gram positivos, cujas células podem apresentar o diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μm e que, por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio óptico (**Figura 4**), aparecem na forma de cachos de uva (origem dos termos gregos “*staphyle*” cacho de uva e “*coccus*” grão ou semente), aos pares ou em cadeias curtas, são catalase positivos e com capacidade de fermentação anaeróbica de glicose (FDA, 1998; JABLONSKI; BOHACH, 2001).

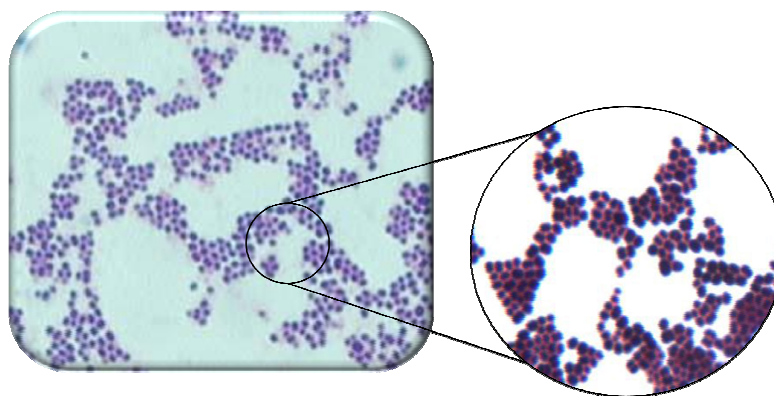


Figura 4. Microscopia óptica de esfregaço de *Staphylococcus* sp. (coloração de Gram); Detalhe aproximado: característica de agrupamento entre as células (formato de “cachos de uva”).

Fonte: microbelibrary.org (adaptado).

Estes micro-organismos são comensais de superfícies corporais de animais de sangue quente, fazendo parte da microbiota da pele e mucosas e dos tratos respiratório e gastrointestinal. São resistentes ao congelamento, podendo sobreviver em alimentos à -20°C , porém não resistem à pasteurização (ICMSF, 1996; FDA, 1998). São caracterizados por serem bactérias mesófilas, com desenvolvimento ótimo na faixa de pH entre 6 e 7 e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio e a nitratos, desta forma capazes de crescer em meios com valores de atividade de água de 0,86 até 0,83, sendo inferiores aos considerados mínimos para bactérias não halófilas (ICMSF, 1996; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O gênero *Staphylococcus* inclui 44 espécies e 24 subespécies (**Tabela 3**). Algumas espécies são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções oportunistas e intoxicações, tanto em humanos como em animais. São tradicionalmente divididas em dois grupos: as coagulase positivas e as coagulase negativas. Esta divisão é baseada na produção da coagulase, um fator enzimático que causa coagulação do fibrinogênio em fibrina, resultando numa espécie de coágulo, considerada como importante marcador de patogenicidade destes micro-organismos (TRABULSI *et al.*, 1999). A produção da coagulase é um importante

determinante fenotípico na caracterização de isolados de *Staphylococcus*. Sabe-se que o coágulo produzido por esta enzima resulta no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro (FISCHETTI *et al.*, 2000).

Tabela 3. Espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus*.

Espécie	Subespécie	Referência
<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	Schleifer <i>et al.</i> (1985)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>aureus</i> <i>anaerobius</i>	Rosenbach (1884); De La Fuente <i>et al.</i> (1985)
<i>Staphylococcus auricularis</i>	-	Kloos;Schleifer (1983)
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>capitis</i> <i>urealyticus</i>	Kloos;Schleifer (1975); Bannerman;Kloos (1991)
<i>Staphylococcus caprae</i>	-	Devriese <i>et al.</i> (1983)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>carnosus</i> <i>utilis</i>	Schleifer;Fischer (1982); Probst <i>et al.</i> (1998)
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	-	Evans (1916); Schleifer <i>et al.</i> (1982)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	Devriese <i>et al.</i> (1978); Hájek <i>et al.</i> (1987)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>cohnii</i> <i>urealyticus</i>	Schleifer;Kloos (1975); Kloos;Wolfshohl (1991)
<i>Staphylococcus condiment</i>	-	Probst <i>et al.</i> (1998)
<i>Staphylococcus delphini</i>	-	Varaldo <i>et al.</i> (1988)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Winslow;Winslow (1908); Evans (1916)
<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>equorum</i> <i>linens</i>	Schleifer <i>et al.</i> (1985); Place <i>et al.</i> (2003)
<i>Staphylococcus felis</i>	-	Igimi <i>et al.</i> (1989)
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	-	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (2000)
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	-	Devriese <i>et al.</i> (1983)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	Schleifer;Kloos (1975)
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>hominis</i> <i>novobiosepticus</i>	Kloos;Schleifer (1975); Kloos <i>et al.</i> (1998)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Hyicus</i> <i>chromogenes</i>	Sompolinsky (1953); Devriese <i>et al.</i> (1978); Devriese <i>et al.</i> (1978)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	-	Hájek (1976)
<i>Staphylococcus kloosii</i>	-	Schleifer <i>et al.</i> (1985)

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Subespécie	Referência
<i>Staphylococcus lentus</i>	-	Kloos <i>et al.</i> (1976); Schleifer <i>et al.</i> (1983)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-	Freny <i>et al.</i> (1988)
<i>Staphylococcus lutrae</i>	-	Foster <i>et al.</i> (1997)
<i>Staphylococcus massiliensis</i>		Al Masalma <i>et al.</i> (2010)
<i>Staphylococcus microti</i>	-	Nováková <i>et al.</i> (2010)
<i>Staphylococcus muscae</i>	-	Hájek <i>et al.</i> (1992)
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	-	Spergser <i>et al.</i> (2003)
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	-	Chesneau <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	-	Trülsch <i>et al.</i> (2007)
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	-	Tanasupawat <i>et al.</i> (1992)
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	-	Devriese <i>et al.</i> (2005)
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	-	Zakrzewska-Czerwińska <i>et al.</i> (1995)
<i>Staphylococcus rostri</i>		Riesen; Perreten (2010)
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	-	Foubert; Douglas (1948); Kilpper-Bälz; Schleifer (1984)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>saprophyticus</i>	Fairbrother (1940); Shaw <i>et al.</i> (1951); Hájek <i>et al.</i> (1996)
	<i>bovis</i>	
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>schleiferi</i> <i>coagulans</i>	Freny <i>et al.</i> (1988); Igimi <i>et al.</i> (1990)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>sciuri</i> <i>carnaticus</i> <i>lentus</i> <i>rodentium</i>	Kloos <i>et al.</i> (1976); Kloos <i>et al.</i> (1997); Kloos <i>et al.</i> (1976); Kloos <i>et al.</i> (1997)
<i>Staphylococcus simiae</i>	-	Pantucek <i>et al.</i> (2005)
<i>Staphylococcus simulans</i>	-	Kloos; Schleifer (1975)
<i>Staphylococcus succinus</i>	<i>succinus</i> <i>casei</i>	Lambert <i>et al.</i> (1998); Place <i>et al.</i> (2003)
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	-	Webster <i>et al.</i> (1994)
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	Kloos; Schleifer (1975)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	Schleifer; Kloos (1975)

Fonte: adaptado de EUZÉBY, 2010.

S. aureus é um dos agentes patogênicos mais frequentemente envolvidos em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar,

além de ser responsável por surtos de intoxicação alimentar, sendo a espécie mais estudada (TRABULSI *et al.*, 1999; BALABAN; RASOOLY, 2000).

Na microbiologia médica, *S. aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas (tanto na pele como em regiões mais profundas). Quando na pele, as infecções apresentam diferentes designações: foliculites, furunculoses, carbúnculos e impetigo; quando mais profundas podem ser osteomielites, bacteremias, endocardites, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (TRABULSI *et al.*, 1999; BANNERMAN, 2003).

Além de infecções piogênicas, *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja por um processo infeccioso ou não. A primeira possibilidade pode ser exemplificada pela síndrome da pele escaldada ou doença de Ritter, determinada por uma toxina, a esfoliatina. Já as intoxicações, que acontecem na ausência de processos infecciosos, são de dois tipos: a síndrome do choque tóxico, pela produção da toxina do choque tóxico (TSST-1) e a intoxicação alimentar, através da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos (TRABULSI *et al.*, 1999; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

Dentre as espécies de interesse em alimentos, somente seis são coagulase positivas, (*S. aureus* subesp. *anaerobius*, *S. aureus* subesp. *aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subesp. *coagulans*), e onze são coagulase negativas (*S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*) (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

2.3. *Staphylococcus* enterotoxigênicos e suas características de patogenicidade

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são patógenos importantes por possuírem muitos fatores de virulência e por sua habilidade de produzir uma grande quantidade e diversidade de proteínas extracelulares (exotoxinas) que

contribuem para a patogenicidade dessas bactérias (BOEREMA; CLEMANS; BRIGHTWELL, 2006).

As exotoxinas produzidas são divididas em dois grupos: os agentes ativos de membrana e as toxinas com atividade de superantígeno. Os primeiros são as alfa-toxina, beta-toxina, delta-toxina, gama-toxina e a leucocidina. A alfa-toxina é uma toxina citolítica formadora de poros e é uma das mais potentes toxinas bacterianas conhecidas. É hemolítica, citotóxica, dermatonecrótica e letal para diversas células (*in vitro* e *in vivo*). A beta-toxina é semelhante à alfa-toxina, porém lisa eritrócitos de apenas alguns animais e de outros não. É única na sua habilidade de lise a baixas e altas temperaturas, sendo produzida principalmente por *S. aureus* provenientes de animais. A delta-toxina também é citolítica, porém possui tamanho menor do que as demais, é termoestável, possui propriedades surfactantes e de lise de muitos tipos de membranas, eritrócitos, organelas e protoplastos bacterianos. A gama-toxina e a leucocidina se diferenciam das demais por possuírem duas proteínas atuando sinergisticamente (FISCHETTI *et al.*, 2000; ELSAYED; LAUPLAND, 2004).

As toxinas com atividade de superantígeno, que estimulam proliferação de células T (de defesa do organismo) não específicas são: TSST-1, toxinas esfoliativas e enterotoxinas estafilocócicas (BALABAN; RASOOLY, 2000). A TSST-1 causa uma doença aguda e sistêmica chamada Síndrome do choque tóxico, cujos sintomas são hipotensão, febre e erupções cutâneas. Esta doença pode ser menstrual ou não. A relacionada com menstruação acomete mulheres cuja mucosa vaginal está colonizada por *S. aureus*. A doença não menstrual resulta de uma infecção por este micro-organismo em qualquer local do corpo (ELSAIED; LAUPLAND, 2004).

As toxinas esfoliativas provocam a síndrome da pele escaldada, doença que atinge principalmente crianças, formando bolhas na pele que se espalham e descamam. Sua atuação ainda não é totalmente conhecida, porém o que se observa é que há separação física das camadas da pele devido à degradação dos desmossomos das células (FISCHETTI *et al.*, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são bem conhecidas por causarem a gastroenterite estafilocócica, provocada pelo consumo de alimentos contaminados (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; FISCHETTI *et al.*, 2000; ELSAYED; LAUPLAND, 2004). *Staphylococcus* quando presentes em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC/mL ou g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e potencial de oxi-redução), produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos (**Tabela 4**), os quais, depois de ingeridos, causam intoxicação alimentar (JABLONSKI; BOHACH, 2001; JAY, LOESSNER; GOLDEN, 2005). As peculiaridades do seu hábitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissível aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Tabela 4. Parâmetros importantes para o desenvolvimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas em alimentos.

Parâmetro	Desenvolvimento		Produção de enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Ótima	Variação
Temperatura (°C)	35 -37	7 - 48	35 – 40	1 -45
pH	6,0 – 7,0	4,0 – 10,0	6,0 – 7,0	4,9 – 9,0
Aa	>0,99	0,83 – 0,99	0,99	0,83 – 0,99
NaCl (%)	0 - 4	0 - 20	0 – 0,5	0 - 10
Atmosfera	Aeróbia	Aeróbia Anaeróbia	Aeróbia (5-20% O ₂)	Aeróbia Anaeróbia

Fonte: ICMSF, 1996.

Entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, *S. aureus* é a espécie que está mais associada às doenças estafilocócicas por suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (OMOE *et al.*, 2005). Com relação à população mundial, aproximadamente de 30 a 50% são considerados portadores de *S. aureus* em sua pele ou mucosas e observou-se que destes micro-

organismos, 30 a 50% demonstraram ser enterotoxigênicos (BERGDOLL, 1989; ICMSF, 1996; JABLONSKI; BOHACH, 2001). Outras espécies produtoras de coagulase já conhecidas por produzirem enterotoxinas são *S. hyicus* e *S. intermedius* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). A produção de enterotoxinas por espécies coagulase negativas foi relatada em diversos estudos sob condições laboratoriais (**Tabela 5**).

Tabela 5. *Staphylococcus* coagulase negativa produtores de enterotoxinas *in vitro*.

Espécie	Referência
<i>S. capitis</i>	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (1996); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. caprae</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. carnosus</i>	Zell <i>et al.</i> (2008)
<i>S. chromogenes</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Oliveira <i>et al.</i> (2010); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. cohnii</i>	Bautista <i>et al.</i> (1988); Rapini <i>et al.</i> (2005); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. epidermidis</i>	Crass; Bergdoll (1986); Bautista <i>et al.</i> (1988); Valle <i>et al.</i> (1990); Udo <i>et al.</i> (1999); Rapini <i>et al.</i> (2005); Cunha <i>et al.</i> (2006); Mariano <i>et al.</i> (2007); Al-Tarazi; Albetar; Alaboudi (2009)
<i>S. equorum</i>	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (1996); Zell <i>et al.</i> (2008)
<i>S. haemolyticus</i>	Bautista <i>et al.</i> (1988); Valle <i>et al.</i> (1990); Li; Cheng (1997); Udo <i>et al.</i> (1999); Cunha <i>et al.</i> (2006); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. hominis</i>	Udo <i>et al.</i> (1999)
<i>S. hyicus</i>	Hoover <i>et al.</i> (1983)
<i>S. lentus</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (1996)
<i>S. lugdunensis</i>	Cunha <i>et al.</i> (2006); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. psifermentans</i>	Zell <i>et al.</i> (2008)
<i>S. saprophyticus</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Udo <i>et al.</i> (1999)
<i>S. scheiferi</i>	Udo <i>et al.</i> (1999)
<i>S. sciuri</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Al-Tarazi; Albetar; Alaboudi (2009)
<i>S. simulans</i>	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (1996); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. warneri</i>	Valle <i>et al.</i> (1990); Chou; Chen (1997); Li; Cheng (1997); Udo <i>et al.</i> (1999); Mariano <i>et al.</i> (2007)
<i>S. xylosus</i>	Bautista <i>et al.</i> (1988); Valle <i>et al.</i> (1990); Vernozy-Rozand <i>et al.</i> (1996); Rodriguez <i>et al.</i> (1996); Zell <i>et al.</i> (2008)
CNS*	Nanu; Narayan (1992); Lamaita <i>et al.</i> (2005); Borelli <i>et al.</i> (2006); Stamford <i>et al.</i> (2006); Vargun; Vatansever (2007); Veras <i>et al.</i> (2008)

*Espécies não identificadas.

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem a uma ampla família de exotoxinas pirogênicas com relações filogenéticas comuns, estrutura, função e sequências homólogas (BALABAN; RASOOLY, 2000). São um grupo de proteínas extracelulares, de cadeia simples, com baixa massa molecular (26 a 30 kDa) e ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,6. São ricas em aminoácidos lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico, e a maioria apresenta alça de cistina, a qual está provavelmente relacionada à sua atividade emética. São resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestório e são hidrossolúveis (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Porém, sua principal característica é a sua resistência ao aquecimento a 100°C por 30 minutos, pois, desta forma, mesmo os alimentos que sofreram tratamento térmico continuam a apresentar riscos aos consumidores (DABROWSKI; SIKORSKI, 2005). A pasteurização elimina as células vegetativas em processos fermentativos ou de maturação de queijos, prevenindo o crescimento de patógenos nos alimentos. Porém, com a presença de enterotoxinas pré-formadas no alimento, mesmo após processamento térmico, há a manutenção de sua atividade biológica (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

As enterotoxinas são nomeadas com letras do alfabeto segundo a ordem cronológica de suas descobertas. Tradicionalmente, cinco tipos são conhecidos como “clássicos”, sendo SEA, SEB, SEC, SED e SEE (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000), por serem as mais comumente identificadas e estudadas. Entretanto, desde a década de 1990 até os tempos recentes, novos tipos foram descobertos e reportados (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET e SEU) (**Tabela 6**).

As enterotoxinas estafilocócicas podem ser codificadas por genes presentes em plasmídeos, como os genes *sed*, *sej*, *ser*, *ses* e *set* (BAYLES; IANDOLO, 1989; ZHANG *et al.*, 1998; OMOE *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2008), presentes em bacteriófagos como *sea* e *see* (BETLEY; MEKALANOS, 1988) ou em cromossomos, como *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, e *seq* (LETERTRE *et al.*, 2003). Além disso, diferentes genes podem estar em ilhas de patogenicidade, segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano, que atribuem uma variedade de características de virulência aos micro-organismos

(VIEIRA, 2009), como o gene *sec* (FITZGERALD *et al.* 2001) ou *seb*, *sek* e *seq* (YARWOOD *et al.* 2002).

Tabela 6. Diferentes enterotoxinas e suas variações produzidas por *Staphylococcus*.

Enterotoxinas	Referência
SEA	Betley; Mekalanos (1988); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEB	Bergdoll <i>et al.</i> (1959); Jones; Khan (1986); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEC ₁	Bergdoll <i>et al.</i> (1965); Borja; Bergdoll (1967); Bohach; Schievert (1987); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEC ₂	Bergdoll <i>et al.</i> (1965); Avena; Bergdoll (1967);
SEC ₃	Reiser <i>et al.</i> (1984)
SED	Casman <i>et al.</i> (1967); Bayles; landolo (1989); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEE	Bergdoll <i>et al.</i> (1971); Couch <i>et al.</i> (1988); Becker <i>et al.</i> (1998)
SEG	Betley <i>et al.</i> (1992); Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEG _v	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEH	Ren <i>et al.</i> (1994); Su; Wong (1995); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEI	Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEI _v	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEJ	Zhang <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEK	Orwin <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEL	Fitzgerald <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEM	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEN	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Orwin <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEN _v	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEO	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEP	Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEQ	Yarwood <i>et al.</i> (2002); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SER	Omoe <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SES	Ono <i>et al.</i> (2008)
SET	Ono <i>et al.</i> (2008)
SEU	Letertre <i>et al.</i> (2003)
SEU _v	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)

Fonte: BORGES, 2006 (modificado).

O sequenciamento parcial dos aminoácidos das enterotoxinas SEA, SEB e SEC evidenciou a existência de região homóloga nas três moléculas, sugerindo que essa região seja o sítio ativo da molécula (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001). Embora sejam similares em sua composição e atividade biológica, as enterotoxinas são identificadas separadamente em função de diferenças antigênicas. Várias enterotoxinas sorologicamente distintas têm sido reconhecidas e classificadas de SEA até SEU e seus genes de *sea* até *seu* (OMOE *et al.*, 2005). Uma toxina previamente designada enterotoxina F, é atualmente conhecida como responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) e não por enterite (BERGDOLL *et al.*, 1981).

O genoma de *Staphylococcus* é constituído por uma mistura complexa de genes, sendo que muitos deles demonstram ser adquiridos por transferência lateral entre bactérias. Grande parte dos genes de resistência a antibióticos estão em plasmídeos ou em elementos genéticos de mobilidade, formando “ilhas de resistência”. Três classes de novas ilhas de patogenicidade foram identificadas no genoma: uma família de ilhas referente à síndrome do choque tóxico (TSST-1), ilhas de exotoxinas e ilhas de enterotoxinas. Estas observações significam não apenas a extrema complexidade do genoma das bactérias deste gênero, mas também sua plasticidade e facilidade em se adaptar a pressões seletivas, como a antibióticos e ao sistema imunológico humano (KURODA *et al.*, 2001).

2.4. Intoxicação Alimentar Estafilocócica

A intoxicação estafilocócica foi primeiramente estudada em 1894 por J. Denys e posteriormente por M.A. Barber em 1914, que produziu em si próprio os sintomas da doença através da ingestão de leite previamente contaminado com uma cultura de *S. aureus* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, as quais são produzidas por algumas

espécies de *Staphylococcus*. A barreira de suco gástrico e as condições no intestino inibem o crescimento da bactéria e a produção de toxinas dentro do organismo, sendo assim a gastroenterite é causada somente pela toxina que é produzida fora do organismo hospedeiro (DABROWSKI; SIKORSKI, 2005; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O período de incubação da doença oscila de 30 minutos a 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (BANNERMAN, 2003). Os principais sintomas são náusea, cólicas abdominais (as quais são, geralmente, muito agudas), diarreia eventual e sudorese, ainda podendo ocorrer dor de cabeça, calafrios e queda de pressão arterial. Em geral não há febre. Estes sintomas variam conforme o grau de susceptibilidade do indivíduo, concentração da toxina no alimento e quantidade de alimento ingerido. A duração dos sintomas é, geralmente, de 24 a 48 horas, e a taxa de mortalidade é bastante baixa ou nula, variando de 0,03% para pessoas em geral a 4,4% para a população mais susceptível, como crianças e idosos (ICMSF, 1996; FRANK, 2001).

A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação é bem pequena. A dose emética em um macaco é de aproximadamente 5–20 µg por animal, segundo Borja; Bergoll (1967). Nos Estados Unidos, Evenson *et al.* (1988), estudaram um surto de gastroenterite e descobriram que a quantidade de enterotoxina SEA presente no leite incriminado era de 0,5 ng/mL, e que para causar os efeitos da intoxicação nos consumidores eram necessárias de 100 a 200 ng de enterotoxina. Os autores atribuíram a presença da toxina no leite já pasteurizado às falhas na produção e resfriamento do leite cru, antes do processamento térmico.

Os alimentos mais comumente associados a surtos são carnes e derivados de bovinos, suínos e aves, ovos, leite e derivados, produtos de confeitaria recheados com creme, bombas de chocolate, enfim, alimentos que requerem manipulação durante seu preparo e que são mantidos em temperaturas inadequadas (GERMANO; GERMANO, 2001). A temperatura de refrigeração dos alimentos é um fator limitante para a produção destas enterotoxinas, havendo

maior probabilidade de produção a 37°C (PEREIRA, 1982). Este fato reforça a importância da conservação dos alimentos a temperaturas abaixo de 4 °C e o perigo da utilização de produtos derivados do leite na preparação de pratos que podem permanecer expostos durante longos períodos à temperatura ambiente, tais como patês.

A enterotoxina SEA é a mais envolvida em surtos de intoxicações nos Estados Unidos, seguida pelas enterotoxinas SED e SEB (BALABAN; RASOOLY, 2000). Sabe-se que aproximadamente 95% dos casos de intoxicações estafilocócicas são causados pelas enterotoxinas “clássicas”, os 5% restantes são associados com as demais enterotoxinas recentemente identificadas (OMOE *et al.*, 2002). Ainda há poucos dados referentes a estas novas enterotoxinas causadoras de surtos de intoxicação, mas algumas delas podem exercer atividade emética similar às enterotoxinas clássicas (CHEN; CHIOU; TSEN, 2004; BLAIOTTA *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2004; JORGENSEN *et al.*, 2005; IKEDA *et al.*, 2005; ONO *et al.*, 2008).

Entre as principais doenças transmitidas por alimentos, a gastroenterite estafilocócica é considerada a terceira mais importante no mundo (NORMANNO *et al.*, 2005; BOEREMA; CLEMANS; BRIGHTWELL, 2006).

Estas doenças apresentam grande impacto sobre questões de saúde pública. No período entre 1999 e 2008, foram notificados, no Brasil, 6.062 surtos de doenças transmitidas por alimentos, havendo envolvimento de 117.330 pessoas doentes e 64 casos de óbitos (**Figura 5**). Dentre estes surtos, o agente etiológico foi ignorado ou não identificado em 51% (3.088), sendo que as bactérias foram responsáveis pela grande maioria deles (84% de 2.974 surtos cujos agentes etiológicos foram identificados), e as principais foram *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (SVS, 2008).

Como apresentado nas **figuras 6 e 7**, as espécies do gênero *Staphylococcus* foram responsáveis por 600 surtos no Brasil (20,2%), sendo o segundo maior agente causador de doenças transmitidas por alimentos. Os produtos derivados do leite estavam relacionados a 284 surtos (7,1%) e a maioria

deles ocorreu em ambientes residenciais, seguido de restaurantes e instituições de ensino (SVS, 2008).

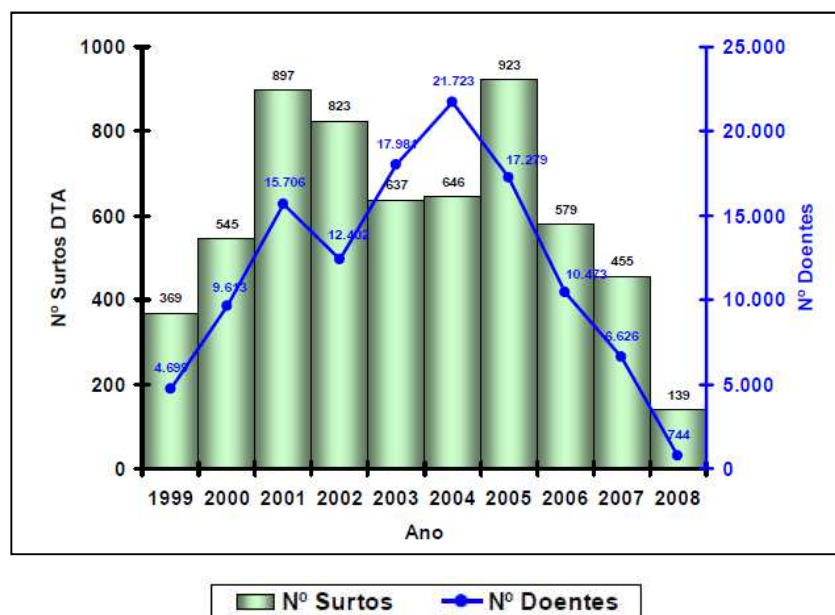


Figura 5. Surtos de DTA e números de doentes no Brasil (1999-2008).
FONTE: SVS, 2008.

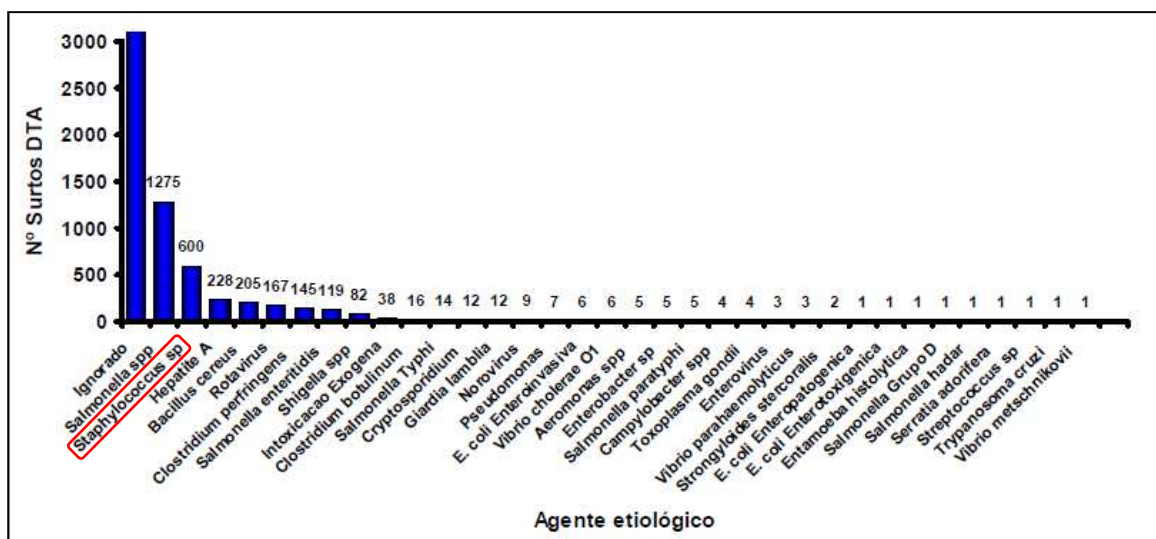


Figura 6. Surtos de DTA por agente etiológico ocorridos no Brasil no período de 1999 a 2008.
FONTE: SVS, 2008.

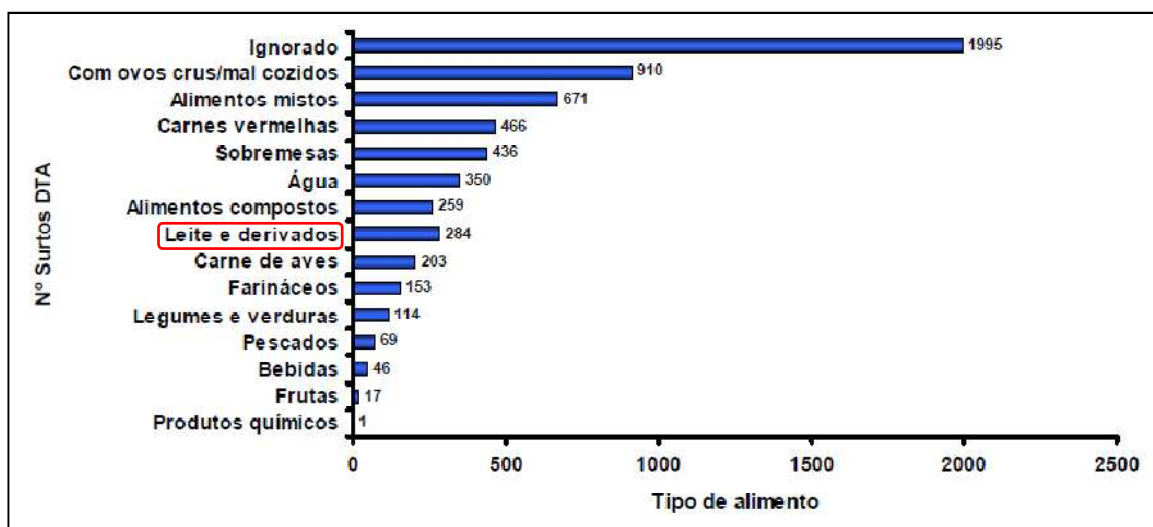


Figura 7. Surtos de DTA por tipo de alimento contaminado ocorridos no Brasil no período de 1999 a 2008.
 FONTE: SVS, 2008.

Sabioni; Hirooka; Souza (1988) relataram um surto de intoxicação alimentar ocorrido em julho de 1987, na cidade de Ouro Preto-MG. O alimento causador foi queijo Minas, contaminado por *S. aureus* com $9,3 \times 10^7$ UFC/g e detectaram cepas produtoras de SEA, SEB, SED e SEE.

Em Minas Gerais, segundo CARMO *et al.* (2002), no ano de 1999, 50 pessoas ficaram doentes após terem ingerido queijo Minas contaminado por *S. aureus* produtores de enterotoxinas SEA, SEB e SEC. Uma possível implicação quanto à fonte de contaminação se deve à manipulação durante o preparo do queijo.

Segundo registros do Sistema de Informação Regional para a Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA, 2002), durante o período de 1993 a 2002, no Brasil, ocorreram 18 surtos relacionados ao consumo de leite e derivados, sendo a grande maioria queijos (**Tabela 7**).

Tabela 7. Surtos de intoxicação estafilocócica relacionados à ingestão de derivados lácteos no Brasil (1993-2002).

Data	Cidade	Alimento	Agente etiológico	Enfermos
20/03/1996	Belo Horizonte, MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
22/08/1996	Belo Horizonte, MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	8
26/09/1996	Belo Horizonte, MG	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
		Mussarela		
30/05/1999	Belo Horizonte, MG	Leite	<i>S. aureus</i>	3
26/07/1999	Arapongas, PR	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	7
28/01/1999	Curitiba, PR	Leite	<i>S. aureus</i>	4
03/04/1999	Curitiba, PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	3
11/11/1999	Curitiba, PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
21/11/1999	Curitiba, PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
23/07/1999	P. Frontim, PR	Queijo	<i>S. aureus</i>	5
09/10/1999	Viamão, RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
02/01/2000	Rio Grande, RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	12
22/01/2000	Caxias do Sul, RS	Queijo	<i>S. aureus</i>	8
02/05/2000	Quedas do Iguacu, PR	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	4
05/02/2000	Itapajé, CE	Queijo	<i>S. aureus</i>	7
04/06/2000	Porto Alegre, RS	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	3
18/07/2000	Fortaleza, CE	Queijo	<i>S. aureus</i>	7
22/03/2002	Autazes, AM	Queijo	<i>S. aureus</i>	4
TOTAL				93

Fonte: INPPAZ/OPS/OMS (SIRVETA, 2002).

Em Brodowski-SP, em 1998, ocorreu um surto envolvendo 180 pessoas. O agente etiológico incriminado foi *S. aureus*, sendo isolado de salada de vegetais com maionese, frango grelhado e macarrão com molho de tomate, como também de manipuladores dos alimentos, além da detecção de produção enterotoxina SEA pelos isolados (COLOMBARI *et al.*, 2007).

Em Passos-MG, 42 pessoas foram envolvidas em um surto de intoxicação estafilocócica em um restaurante. O alimento incriminado apresentou contagens de *S. aureus* superiores a 2×10^8 UFC/g e as cepas isoladas eram produtoras de SEA, SEB e SEE. Manipuladores assintomáticos eram portadores de cepas produtoras de enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED (CARMO *et al.*, 2003).

Em 2004 ocorreu um surto de intoxicação alimentar na cidade de Pelotas-RS envolvendo 56 pessoas em um restaurante institucional. *S. aureus* produtor de enterotoxina SEA foi detectado em sanduíches de galinha (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Outro caso de intoxicação devido a *Staphylococcus* coagulase positiva produtor de enterotoxina SEA, ocorreu na cidade de Birigui-SP. O alimento incriminado foi farofa (farinha de mandioca e de milho, ervilha e milho em conserva, mortadela picada e linguiça tipo toscana) servida na merenda escolar e 1200 crianças apresentaram sintomas de intoxicação. As contagens chegaram a $8,5 \times 10^7$ UFC/g e provavelmente a contaminação foi proveniente de fonte humana, através de manipuladores assintomáticos (MICHELIN; CARMO; CARLOS, 2006).

Leite e seus derivados estiveram relacionados a 5% do total de surtos reportados na França no período de 1988 a 1997. Os queijos foram os alimentos mais incriminados (47 surtos) e *S. aureus* foi o patógeno responsável por 59 (85,5%) do total de 69 surtos (DE BUYSER *et al.*, 2001).

Um extenso surto de intoxicação estafilocócica ocorreu no Japão no ano de 2000, devido à ingestão de produtos cujo principal ingrediente foi leite em pó desnatado contaminado com enterotoxina SEA e SEH (ASAO *et al.*, 2003; IKEDA *et al.*, 2005).

Em junho de 2007, na Áustria, houve um surto acometendo 40 crianças de duas instituições escolares. O estudo epidemiológico apontou a presença de *S. aureus* portadores de genes codificadores de SEA e SED e detectaram-se as respectivas enterotoxinas em leites naturais e leites com sabor (baunilha e cacau) servidos às crianças (SCHMID *et al.*, 2009).

No final do ano de 2009, seis surtos de intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* foram reportados na França. O alimento incriminado para os seis surtos foi um tipo de queijo fresco feito com leite não pasteurizado. O micro-organismo detectado foi *S. aureus* e a enterotoxina produzida no alimento foi SEE (OSTYN *et al.*, 2010).

Nos países da América Latina, destacam-se Cuba e Venezuela como os principais países com casos de surtos de intoxicação estafilocócica relacionados ao consumo de derivados lácteos, como demonstrado na **Tabela 8** (SIRVETA, 2002). Nota-se uma grande diferença no número de surtos no Brasil (18 surtos) e em outros países latinos, como a Venezuela (68 surtos) durante o mesmo período de tempo. Este fato não se deve a uma melhor qualidade dos produtos no Brasil, mas sim à diferença na quantidade de notificações realizadas aos órgãos de vigilância sanitária. Os números de surtos no Brasil e na América latina são subestimados devido à baixa notificação.

Tabela 8. Surtos de intoxicação estafilocócica relacionados à ingestão de derivados lácteos em países da América Latina (1993-2002).

País	Alimento	Agente etiológico	Nº de surtos	Nº de enfermos
Rep. Dominicana	Leite	<i>S. aureus</i>	1	916
Argentina	Leite pasteurizado	<i>S. aureus</i>	1	98
Panamá	Arroz com leite	<i>Staphylococcus</i> sp.	1	10
Venezuela	Queijos	<i>Staphylococcus</i> sp.	68	963
	Leite	<i>Staphylococcus</i> sp.	1	78
México	Queijo fresco	<i>S. aureus</i>	1	6
Uruguai	Queijo	<i>S. aureus</i>	2	38
	Queijo artesanal	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2	8
Nicarágua	Crema de coalhada	<i>S. aureus</i>	1	129
	Queijo	<i>Staphylococcus</i> sp.	1	51
Cuba	Queijos	<i>S. aureus</i>	21	248
	Arroz com leite	<i>S. aureus</i>	1	12
	Produtos lácteos	<i>S. aureus</i>	8	85
	Crema	<i>S. aureus</i>	7	188
	Queijo com goiabada	<i>S. aureus</i>	1	12
	Sorvete	<i>S. aureus</i>	1	120
	Leite	<i>S. aureus</i>	2	11
Bolívia	Produtos lácteos	<i>Staphylococcus</i> sp.	1	1195
TOTAL			121	4168

Fonte: INPPAZ/OPS/OMS (SIRVETA, 2002).

Por muito tempo, as espécies coagulase negativas foram consideradas não patogênicas, porém este fato está mudando, especialmente por ter aumentado o número de evidências de sua patogenicidade pela produção de enterotoxinas ou por causarem doenças e infecções no ser humano. Diversos estudos já evidenciaram a enterotoxigenicidade de espécies coagulase negativas em meios de cultivo laboratorial (**Tabela 5**). O longo tempo em que apenas a prática de analisar alimentos quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva como espécies de importância teve, sem dúvida, subestimado o número de espécies potencialmente patogênicas (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; IRLINGER, 2008). No Brasil, os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC Nº12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), determinam limites apenas para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, apontando riscos a apenas este grupo de micro-organismos.

São apenas três os relatos de surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativas. O primeiro deles ocorreu no Japão (OMORI; KATO, 1959) com a participação de 40 estudantes, onde o agente causal foi igualmente detectado nas fezes e em superfícies de pratos utilizados no lanche. Já nos Estados Unidos, 145 pessoas manifestaram a doença, *S. epidermidis* produtor de SEA foi detectado na carne assada consumida e também em lesões secas de impetigo presentes nas mãos de um manipulador, caracterizando o primeiro registro de detecção da enterotoxina por cepas coagulase negativas (BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971). No Brasil, segundo CARMO *et al.* (2002), no ano de 1999 o serviço sanitário da secretaria de saúde do estado de Minas Gerais foi notificado quanto a um surto envolvendo 328 pessoas que apresentaram sintomas de diarreia e vômito após consumo de leite cru. O agente etiológico deste caso foi *Staphylococcus* coagulase negativa, com contagens superiores a 2×10^8 UFC/g e a produção de enterotoxinas SEC e SED foi constatada pelas capas isoladas. A possível implicação quanto à fonte de contaminação foi a mastite bovina no leite cru.

2.5. Ocorrência de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em leite e derivados

O leite e seus derivados constituem excelentes meios para o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, sendo um ótimo substrato para o crescimento de *Staphylococcus*, especialmente por apresentar alto conteúdo de água, pH próximo à neutralidade e uma variedade de nutrientes disponíveis (FRANK, 2001; DE BUYSER *et al.*, 2001), tornando os derivados lácteos fontes conhecidas de casos de surtos de DTA (DE BUYSER *et al.*, 2001; CARMO *et al.*, 2002; ASAO *et al.*, 2003; JORGENSEN, *et al.*, 2005).

Staphylococcus além de serem contaminantes de diversos tipos de alimentos, como saladas de batata, atum, frango e presunto e outras carnes cozidas, apresentam-se como um conjunto de micro-organismos comumente isolados de leite cru e proveniente de gado leiteiro com mastite. Desta forma, sua presença no leite é a maior preocupação quanto à manutenção da segurança e inocuidade de seus derivados (DELBES *et al.*, 2006). Em geral, é esperado encontrar *Staphylococcus* sp., mesmo que em número baixo, em algum ou em todos os produtos que são de origem animal ou que sejam diretamente manipulados por humanos (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Estes micro-organismos podem formar biofilmes, agregados de células envoltos por uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre as microcolônias (LAWRENCE *et al.*, 1991). Este tipo de organização é extremamente vantajoso para a bactéria, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT; MCBAIN; RICHARD, 2003). Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana que contamina os alimentos devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Desta forma, pode colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios (MARSHALL, 1992; ZOTTOLA, 1994).

A resolução RDC 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece a contagem de no máximo 10^3 UFC/g ou mL para *Staphylococcus* coagulase positiva em derivados do leite, porém, números superiores ($>10^4$ UFC/g ou mL) são comumente relatados (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000; SALOTTI *et al.*, 2006; RALL *et al.*, 2008).

No Brasil, diversos estudos relacionados à presença de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em leite e produtos lácteos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos. Lamaita *et al.* (2005) avaliaram leite cru refrigerado a 4°C por 48h, em Minas Gerais, quanto a detecção e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa. Foram identificadas 8 espécies e a produção de enterotoxinas foi constatada em 91 isolados, sendo 24,6% coagulase positivos e 41,3% coagulase negativos. A enterotoxina identificada mais frequentemente foi a SEC e as principais espécies identificadas foram *S. aureus* e *S. hyicus*.

Silva; Carmo; Silva (2005) analisaram a enterotoxigenicidade de 100 isolados de *S. aureus*, provenientes de amostras de leite de cabra e leite bovino mastítico, quanto à produção de SEA, SEB e SEC por dois métodos imunológicos diferentes (OSP e RPLA) e pela presença dos respectivos genes codificadores através da técnica de PCR. Houve a detecção de 33 isolados positivos para o gene *sec*. Comparando os resultados, houve discordância entre os métodos de análise utilizados.

Stamford *et al.* (2006) isolaram e identificaram 109 culturas de *Staphylococcus* a partir de leite retirado de vacas com sinais de mastite do estado de Pernambuco. As espécies coagulase positivas produtoras de enterotoxinas foram *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, além de *S. chromogenes* e de outras duas cepas coagulase negativas cujas espécies não foram identificadas.

Em São Paulo, Nader Filho *et al.* (2007) isolaram *S. aureus* em leite mastítico e 91,7% dos isolados foram produtores de pelo menos uma enterotoxina (entre SEA, SEB, SEC e SED e TSST-1) e apenas 8,3% não eram enterotoxigênicos.

Rall *et al.* (2008) isolaram e identificaram *S. aureus* de 162 amostras de leite, sendo 54 antes da pasteurização, 54 após processamento térmico e 54 no

último dia de validade. As maiores contagens encontradas foram nos leites não pasteurizados, chegando a $8,9 \times 10^5$ UFC/mL e 70,4% (38/54) das amostras ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação. Isolados de *S. aureus* foram avaliados quanto à presença de genes codificadores de enterotoxinas SEA a SEE e SEG a SEJ. Dos 57 isolados, 68,4% (39/57) possuíam um ou mais genes, sendo que entre os genes para as enterotoxinas clássicas, o mais frequentemente encontrado foi o *sea*, aparecendo em 41% dos isolados (16/39).

Esper (2006) obteve 55 isolados de *Staphylococcus* em amostras de ricotas comercializadas em Campinas-SP. Dos 55 isolados, 23,64% (13/55) eram produtores de enterotoxinas clássicas, sendo 4 isolados coagulase positiva (com características atípicas de colônias em meio Baird-Parker) e 9 coagulase negativa.

A presença de *Staphylococcus* em queijos Minas frescal é muito comum. Almeida Filho; Nader Filho (2000) verificaram contagens de *S. aureus* acima dos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001) para queijos Minas Frescal (10^3 UFC/g) em 50% (40/80) das amostras analisadas deste produto, sendo 10^5 UFC/g os valores médios de contagem encontrados. Já no Rio de Janeiro, analisando o mesmo derivado lácteo, Araújo *et al.* (2002) verificaram que 17,7% das amostras estavam acima do limite estabelecido e que 20% (9/45) delas apresentavam *S. aureus*.

O Programa de Análise Fiscal (Programa Paulista 2002), instituído pelo Centro de Vigilância Sanitária em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz, analisou 123 amostras de queijo Minas Frescal, das quais, 28,5% (35/123) não estavam em conformidade com os padrões microbiológicos para coliformes totais, coliformes fecais e *S. aureus*. Conforme este programa, o queijo Minas frescal foi inserido na categoria de produtos que apresentam maiores riscos de causarem doenças transmitidas por alimentos (SÃO PAULO, ESTADO, 2003). Este mesmo estudo analisou sorvetes de massa à base de leite e 10,6% (14/132) amostras foram consideradas insatisfatórias por conter bactérias do grupo coliformes totais, coliformes fecais e *S. aureus* acima dos limites máximos tolerados.

Analisando queijos Minas frescal em Jaboticabal-SP, Salotti *et al.* (2006) realizaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em 30

amostras industriais e 30 artesanais e verificaram que 30% (18/60) das amostras apresentaram contagens em desacordo com a legislação (BRASIL, 2001), sendo 20% de amostras artesanais e 10% industriais. As contagens alcançaram 5×10^4 UFC/g.

Em Campinas-SP, 93 amostras de queijos Minas frescal produzidos por 3 diferentes processos e comercializados em supermercados locais foram analisados quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e 7,5% das amostras (7/93) apresentaram contagens acima do limite considerado seguro pela legislação brasileira (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007).

Amostras de leite cru, culturas *starter*, requeijão e queijos Canastra foram analisadas em Minas Gerais por Borelli *et al.* (2006), que verificaram a ocorrência de *Staphylococcus* além da produção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED. *Staphylococcus* foram detectados em todos os produtos e as contagens alcançaram $7,9 \times 10^4$ UFC/mL nos leites e 2×10^6 UFC/g nos requeijões e queijos. Quanto à enterotoxigenicidade, 93,3% (70/75) dos isolados produziram pelo menos uma das enterotoxinas testadas. Confirmaram-se as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, além de *Staphylococcus* coagulase negativa (sem identificação de espécies) produtores de enterotoxinas.

Em Botucatu-SP, amostras de leite, queijos frescos e curados, sorvetes e iogurtes, além de doces, biscoitos e sanduíches, foram analisadas quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Verificou-se que 15% (26/172) das amostras apresentaram os micro-organismos em questão e 54% dos isolados eram enterotoxigênicos e produziram enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, sendo a SEC a mais frequentemente detectada (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

André *et al.* (2008) analisaram 140 amostras, sendo 24 de leite cru, 24 de queijos Minas frescal e 92 de manipuladores de alimentos, no estado de Goiás e identificaram 73 isolados de *S. aureus*, sendo que 70,8% (17/24) das amostras de queijos estavam contaminadas com *S. aureus*, e 54,2% (13/24) apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/g, máximo estabelecido para o produto, chegando a 10^5 UFC/g.

Entre diversos outros alimentos, Cunha Neto; Silva; Stamford (2002) analisaram queijo de coalho, produzidos no estado de Pernambuco, quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênicos. As contagens variaram de $<10^2$ a 10^4 e as cepas isoladas a partir de queijo de coalho foram 100% positivas para enterotoxinas clássicas, detectadas pelo sistema VIDAS (bioMérieux-SA).

Borges *et al.* (2008) avaliou uma linha de produção de queijo de coalho em Fortaleza-CE quanto ao perfil de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e negativa (SCN), além da detecção de enterotoxinas clássicas. O leite cru apresentou elevada população de SCN e SCP em 100% das amostras, cujas contagens variaram de 10^3 a 10^7 UFC/mL. Já no produto final (queijo de coalho), SCP com identificação de *S. aureus* foi detectado acima dos limites estabelecidos (10^2 UFC/g), indicando contaminação após pasteurização. Foram identificadas 12 espécies, entre os 68 isolados identificados pelo *kit API-Staph* (bioMérieux), sendo 3 espécies coagulase positivas e 9 coagulase negativas. A presença de enterotoxinas clássicas nos alimentos foi constatada em 20% (4/20) das amostras analisadas e estas foram encontradas no leite cru, e consequentemente no leite pasteurizado, coalhada e queijo coalho, seguindo toda a linha de produção, confirmando a grande resistência térmica das enterotoxinas estafilocócicas.

Fatores como o pH, a população inicial de *Staphylococcus* e a temperatura de armazenamento desempenham um papel importante na produção de enterotoxinas durante a fabricação de queijos. Cada variedade de queijo utiliza diferentes parâmetros tecnológicos (leite cru ou pasteurizado, cultura *starter*, cinética de acidificação, etc.) e os resultados das variáveis possuem influência sobre a natureza e a quantidade de enterotoxinas produzidas (DE BUYSER *et al.*, 2001).

Vargun; Vatansever (2007), analisando amostras de leite e creme na Turquia, encontraram *Staphylococcus* produtores de SEA, SEB, SEC e SEE. Já na Alemanha, *S. aureus* isolados de queijos produzidos a partir de leite de cabra,

testados por métodos enzimáticos e por PCR, apresentaram-se como produtores de SEA e SEC (AKINEIDEN *et al.*, 2008).

Trabalhos recentes no Brasil e no mundo estudam a presença de *Staphylococcus*, enterotoxinas e genes codificadores em queijos, leite bovino cru, leite de cabra e outros derivados do leite, a partir de manipuladores de alimentos e cepas isoladas de vacas mastíticas, obtendo muitos resultados positivos quanto à presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos (PELISSER *et al.*, 2009; KOMATSU *et al.*, 2010; FAGUNDES *et al.*, 2010; MARIANO *et al.*, 2007; HUONG *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2009; RALL *et al.*, 2010; RAHIMI; SAFAI, 2010), reafirmando a grande importância de estudos relacionados a esses micro-organismos e suas enterotoxinas em leite e derivados, além da extrema necessidade de uma melhor qualidade higiênico-sanitária durante sua produção.

2.6. Métodos para detecção de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em alimentos

Há vários métodos disponíveis para a contagem de *Staphylococcus*, com sensibilidade variável em função das características seletivas ou diferenciais como também em função da técnica de contagem (direta em placas ou pelo número mais provável). As principais características seletivas utilizadas no isolamento de *Staphylococcus* são: habilidade de crescer na presença de NaCl (5,5 a 10%), telurito de potássio (0,0025 a 0,005%), cloreto de lítio (0,01 a 0,05%), glicina (0,12 a 1,26%) e polimixina (40 mg/L). As características diferenciais são a capacidade de reduzir o telurito de potássio (colônias pretas em meio sólido), a capacidade de hidrolisar gema de ovo, a capacidade de utilizar manitol, de crescer a 42-43°C, além das atividades de coagulase e termonuclease (DOWNES; ITO, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

O meio de cultura mais amplamente utilizado é o ágar Baird-Parker (BP), meio recomendado pela American Public Health Association (APHA) e Food

and Drug Administration (FDA) para o isolamento de *Staphylococcus* em alimentos, que combina o telurito de potássio (0,01%), a glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos, e a redução do telurito e a hidrólise da lecitina presente na gema de ovo como características diferenciais, formando halos de lecitinase ao redor das colônias. Adicionalmente, o meio contém 1% de piruvato de sódio, considerado excelente para reparação de células injuriadas, evitando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (tóxico para as células) (ICMSF, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

Além do ágar BP, existem outros meios disponíveis para contagem direta em placas, combinando diferentes características seletivas/diferenciais, como o ágar Manitol Sal, ágar Vogel-Johnson, ágar Azida Sangue, ágar Azida Gema de ovo, ágar Fenoltaleína Fosfato de Polimixina, ágar Leite Sal, ágar Telurito Polimixina Gema de ovo, ágar *Staphylococcus* 110; porém estes são considerados restritivos para reparação de injúrias (DIFCO MANUAL, 1994; SILVA *et al.*, 2010).

Outros métodos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) são os *kits* analíticos Petrifilm (3M Microbiology Products). As placas Petrifilm são um sistema pronto de meio de cultura que consiste de uma placa que contém os nutrientes de Baird-Parker modificados e um agente gelificante solúvel em água fria, para contagem rápida de *S. aureus*, sendo uma alternativa a metodologia tradicional para pesquisa de micro-organismos em alimentos (3M Microbiology Products).

Por sua diversidade metabólica, *Staphylococcus* requer uma variedade de testes e abordagens para uma correta identificação (BENNETT, 1996). Para a identificação de espécies pertencentes a este gênero, conjuntos de testes bioquímicos são comumente utilizados, de acordo com o critério proposto por Kloos;Schleifer (1975) e Kloos;Bannerman (1995) (CUNHA *et al.*, 2006; CUNHA; CALSOLARI; ARAÚJO JÚNIOR, 2007). Além disso, existem *kits* rápidos e em miniatura (também baseados em testes bioquímicos), como o Biolog (GP Microplate, Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) (CREMONESI *et al.*, 2005), API-Staph e ID32 Staph (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (HOPPE-SEYLER *et al.*,

2004; MARIANO *et al.*, 2007), Staphylogram identification *kit* (Wako Pure Chemical Industries) (SHIMAMURA; KIDOKORO; MURATA, 2006), Staph-Ident system (Analylab Products) (HÉBERT *et al.*, 1988), Microbact™ Staphylococcal 12S system (Medvet Diagnostics, Thebarton, South Australia) (AL-TARAZI; ALBETAR; ALABOUDI, 2009).

Um exemplo específico é o sistema *API-Staph* (bioMérieux), composto por testes bioquímicos padronizados e em miniatura (utilização de glicose, frutose, manose, maltose, lactose, trealose, manitol, xilitol, melibiose, rafinose, xilose, sacarose, α -metil-glicosídeo, N-acetil-glicosamina, redução de nitrato, produção de acetoina, fosfatase alcalina, arginina dihidrolase e urease), para identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* (**Figura 8**). A positividade em cada um dos testes do sistema corresponde a um determinado número, e ao final o que se obtém é um perfil numérico, que corresponde ao perfil de fermentação de carboidratos e aos resultados dos demais testes. A identificação é, então, obtida confrontando-se este perfil fenotípico obtido com aqueles disponíveis na base de dados do *API-Staph* (apiweb™), gerando a identificação de espécies.

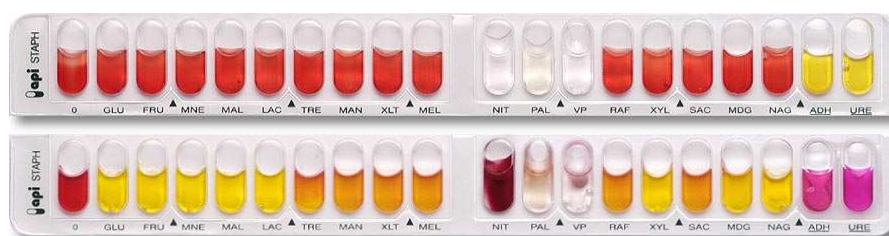


Figura 8. Sistema *API-Staph*; resultados negativos (acima), resultados positivos (abaixo).

Fonte: bioMérieux (apiweb™).

Para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, os métodos biológicos *in vivo* (animal) e *in vitro* (cultura de tecido) são os mais antigos. Os primeiros animais utilizados para o diagnóstico de enterotoxinas estafilocócicas foram gatos (filhotes e adultos), administrados por via

intraperitoneal ou intravenosa, e o macaco Rhesus (*Macaca mullata*), administrado por via oral. Porém, testes em animais não foram usados por muito tempo por considerações éticas e financeiras. As culturas de células são atualmente recomendadas por permitirem ensaios sensíveis, de baixo custo e rápidos (PIMBLEY; PATEL, 1998; NORMANNO *et al.*, 2001).

Ensaio imunológico são muito mais simples e mais baratos do que ensaios biológicos e, portanto, têm sido extremamente utilizados. Estes testes fundamentam-se na capacidade do antígeno (enterotoxina) interagir com anticorpos policlonais específicos, permitindo a formação de um precipitado denominado precipitina (BERGDOLL, 1990). Existem diversas metodologias descritas para cultivo de *Staphylococcus* e produção de enterotoxinas. São ainda muito utilizadas as técnicas denominadas “membrane-over-agar” e “sac culture”, ambas adequadas à posterior detecção por métodos como o “optimum sensitivity plate” (OSP) e, posteriormente, o “microslide test method”. Os níveis de detecção desses métodos podem chegar a até 0,1 µg/mL e 0,05 µg/mL de enterotoxina em meio de cultura, respectivamente (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Estudos de novas metodologias para detecção de enterotoxinas levaram ao desenvolvimento de técnicas imunológicas mais sensíveis e rápidas como *ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), *LA* (*Látex agglutination*), *RPLA* (*Reversed passive latex agglutination*) e *ELFA* (*Enzyme linked Fluorescent Assay*). Atualmente, existem seis *kits* de métodos rápidos disponíveis para detecção de enterotoxinas estafilocócicas (BRETT, 1998). Estes *kits* e seus respectivos ensaios estão apresentados na **Tabela 9**.

O cultivo em caldo BHI líquido (Brain Heart Infusion) é o método recomendado nos *kits* comerciais para detecção de enterotoxinas estafilocócicas. Atualmente, alguns estudos relatam sua eficiência para produção e detecção de enterotoxinas pelo uso destes *kits* comerciais sem necessidade de concentração do cultivo, devido à alta sensibilidade dos métodos (MARÍN; ROSA; CORNEJO, 1992; CHOU; CHEN, 1997; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

Tabela 9. Métodos imunológicos rápidos para detecção de enterotoxinas clássicas.

Toxina	Ensaio (método)	Kit comercial (fornecedor)
A – D	Aglutinação passiva reversa em látex	SET-RPLA (Oxoid)
A – E	ELISA	BOMMELI SET-EIA (Dr. Bommeli AG)
A – E	ELISA	TECRA SET-VIA (Bio Enterprises Pty Ltd.)
A – E	ELISA	RIDASCREEN SET (R-Biopharm GmbH)
A – E	Imunoensaio	TRANSIA (Transia Diffchamb -SA)
A – E	ELFA automatizado	VIDAS-SET (bioMérieux)

Fonte: PIMBLEY;PATEL, 1998 (modificada).

Para avaliar o papel das diversas novas enterotoxinas em casos de surtos de intoxicação por *Staphylococcus* é necessário o desenvolvimento de testes imunológicos específicos para elas. Até o momento, só há *kits* de detecção para as enterotoxinas clássicas (PIMBLEY; PATEL, 1998).

O ensaio VIDAS Staphylococcal enterotoxin (SET) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), com a utilização do equipamento mini VIDAS, fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo, conhecida pelo nome de ELFA (imunoensaio enzima ligada fluorescente), para a detecção simultânea de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C_{1,2,3}, D e E em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* e extratos de alimentos.

Este ensaio imunológico é similar ao ELISA, apresentando como diferença o substrato 4 MUP (4 metil umbeliferil fosfato). No método, os anticorpos monoclonais para as enterotoxinas são adsorvidos numa fase sólida, e nesta são adicionadas as amostras suspendidas. Em seguida, são acrescidos anticorpos mono e policlonais anti-enterotoxina, porém ligados à enzima Fosfatase Alcalina (o que se conhece por conjugado). Segue-se, então, com a adição do substrato enzimático, o 4 MUP, que caso haja toxina na amostra, após ser hidrolisado pela

enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450nm, quando excitada a 370nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida e determina o resultado. Os testes tornam-se mais sensíveis, uma vez que a mínima formação do hidrolisado produz sinais de fluorescência detectáveis (OLIVEIRA, 1999; PEREIRA, 2006).

O equipamento mini VIDAS é responsável pela realização de todas as etapas da reação até a leitura final (pipetagem, lavagens e leitura). O RFV (Valor Relativo de Fluorescência) é calculado e convertido pelo computador em um resultado final do teste, que corresponde ao valor do sobrenadante dividido pelo valor de fluorescência padrão. Qualquer resultado com leitura $<0,13$ é considerado negativo (OLIVEIRA, 1999). O esquema de seu funcionamento e das reações enzimáticas e imunológicas estão indicados na **Figura 9**.

Durante o procedimento deste teste, trabalha-se com o volume de 25mL de cultura em caldo BHI (crescimento à 37°C/48h), pois esta é sempre a alíquota mínima utilizada na análise de um alimento. Além disso, as metodologias descritas no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (DOWNES; ITO, 2001) e no “Bacteriological Analytical Manual” - BAM (2001) consideram este volume de meio BHI semi-sólido (0,7% de ágar) para cultivo de *Staphylococcus* e produção de enterotoxina. A opção por utilizar BHI líquido demonstra-se melhor ao se submeter culturas à agitação, favorecendo a aeração do meio e conseqüentemente à produção de enterotoxinas, inclusive de linhagens pauciprodutoras (PEREIRA *et al.*, 1991). A velocidade de rotação de 170 rpm foi escolhida com base em estudos prévios (PEREIRA *et al.*, 1991; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; PEREIRA, 2006).

Diversas pesquisas recentes utilizaram esta técnica para detecção de enterotoxinas estafilocócicas (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; ASAO *et al.*, 2003; BORGES, 2006; ESPER, 2006; FUJIKAWA; MOROZUMI, 2006; PEREIRA, 2006; STAMFORD *et al.*, 2006; CREMONESI *et al.*, 2007; MORANDI *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008).

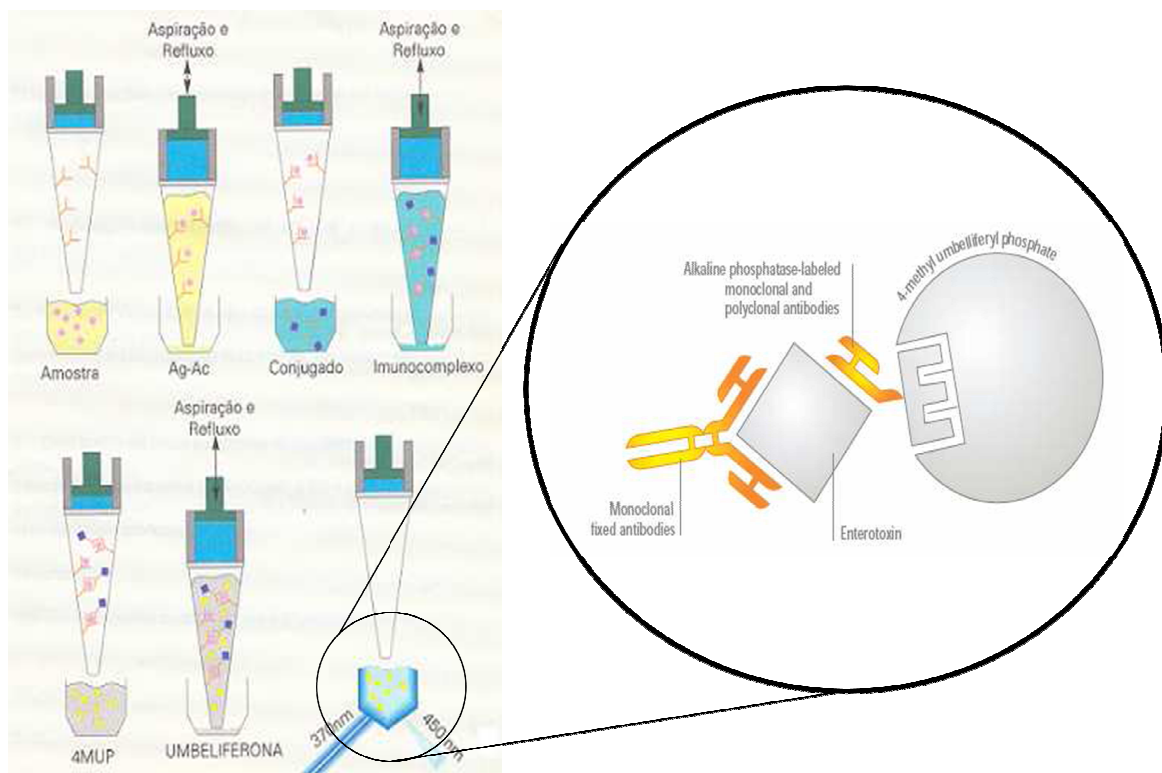


Figura 9. Representação esquemática do método ELFA, para detecção de enterotoxinas de *Staphylococcus*, realizado através do aparelho Mini VIDAS (bioMérieux).

Fonte: Folder Mini VIDAS (adaptado).

Outra forma de se caracterizar possível enterotoxigenicidade de micro-organismos é através de métodos de caracterização molecular, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE) e a ribotipagem, que têm se mostrado ferramentas importantes em investigações epidemiológicas. São métodos reprodutíveis e consistentes para detecção de enterotoxinas *in vitro*, porém confirma-se apenas a existência dos genes, não determinando a expressão dos mesmos (MCLAUCHLIN *et al.*, 2000).

A PCR é aplicada como um método para a detecção dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas estafilocócicas. Uma variação da PCR, a PCR Multiplex, onde se utilizam vários pares de iniciadores específicos

para diferentes sequências-alvo, permite numa mesma reação, detectar vários genes responsáveis pelas toxinas, contribuindo para o estudo epidemiológico destas bactérias e seu envolvimento em doenças de origem alimentar (BECKER; ROTH; PETERS, 1998). Diversos sistemas de PCR-Multiplex foram desenvolvidos para o estudo do perfil dos genes toxigênicos que economizam tempo e trabalho para detectar muitos genes simultaneamente (BECKER; ROTH; PETERS, 1998; MONDAY; BOHACH, 1999; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000; SHARMA; CATHERINE; DODD, 2000; OMOE *et al.*, 2005).

Embora os métodos moleculares não possam provar que sua proteína correspondente seja de fato produzida, as técnicas de PCR oferecem uma alternativa para a detecção de enterotoxinas não-clássicas recentemente descobertas, cujas sequências genéticas são conhecidas (AKINEIDEN *et al.*, 2008). Ainda são necessários diversos estudos para o desenvolvimento de *kits* rápidos que detectem não apenas enterotoxinas clássicas, mas também as novas enterotoxinas estafilocócicas, cujos genes são atualmente muito detectados em *Staphylococcus* isolados de alimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Foram analisadas 104 amostras de derivados lácteos, compreendendo 24 amostras de sorvetes artesanais, 20 amostras de cremes de leite pasteurizados, 20 amostras de patês à base de queijos e 40 amostras de queijos Minas (sendo 20 amostras do tipo meia cura e 20 do tipo frescal). As amostras foram adquiridas no comércio de Campinas-SP, transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, as quais foram submetidas às análises microbiológicas descritas a seguir.

3.2. Análises Microbiológicas

3.2.1. Abertura asséptica e preparo das amostras

As amostras foram retiradas de sua embalagem, após prévia desinfecção com álcool 70% sob condições assépticas, na capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil). Cada unidade amostral foi subdividida para a realização dos ensaios microbiológicos. A massa de 25 gramas de amostra foi determinada em balança semi-analítica (BEL, Piracicaba, Brasil), para posterior homogeneização em equipamento *Stomacher* (Seward, Inglaterra) com 225 mL do diluente citrato de sódio (Labsynth, Diadema, Brasil) a 2% e para diluições posteriores.

3.2.2. Contagem, isolamento e identificação fenotípica de *Staphylococcus* sp.

A contagem de *Staphylococcus* foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (DOWNES; ITO, 2001). As diluições das amostras foram semeadas na superfície do meio de cultura ágar Baird Parker (Difco, EUA), acrescidos de 5% de solução de gema de ovo e salina 0,85% (1:1 peso/peso) e telurito de potássio (Merck, Alemanha) a 0,01%. As placas foram incubadas a 35-37°C por 48h e após, procedeu-se uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g ou mL do alimento).

Foram selecionadas não apenas as colônias típicas crescidas no meio de cultura (colônias circulares, pretas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente), que são características de *Staphylococcus* coagulase positiva, mas também as atípicas (colônias cinzentas sem halo transparente), como demonstrado na **Figura 10**. Desta forma, cinco colônias de cada amostra foram selecionadas e transferidas para ágar e caldo infusão de cérebro e coração ou BHI (Difco, EUA), seguido de incubação a 37°C por 24h para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração de Gram e dos testes bioquímicos de catalase, coagulase em plasma de coelho e nuclease termorreristente ou DNase em ágar DNA azul de toluidina (formulado), segundo Downes; Ito (2001). O procedimento completo para isolamento e caracterização de colônias de *Staphylococcus* sp. está representado na **Figura 11**.

3.2.2.1. Coloração de Gram

A partir de crescimento celular em ágar BHI (Difco, EUA), foi preparado um esfregaço para coloração de Gram em lâminas, observando ao microscópio a presença de bactérias na forma de cocos Gram positivos.

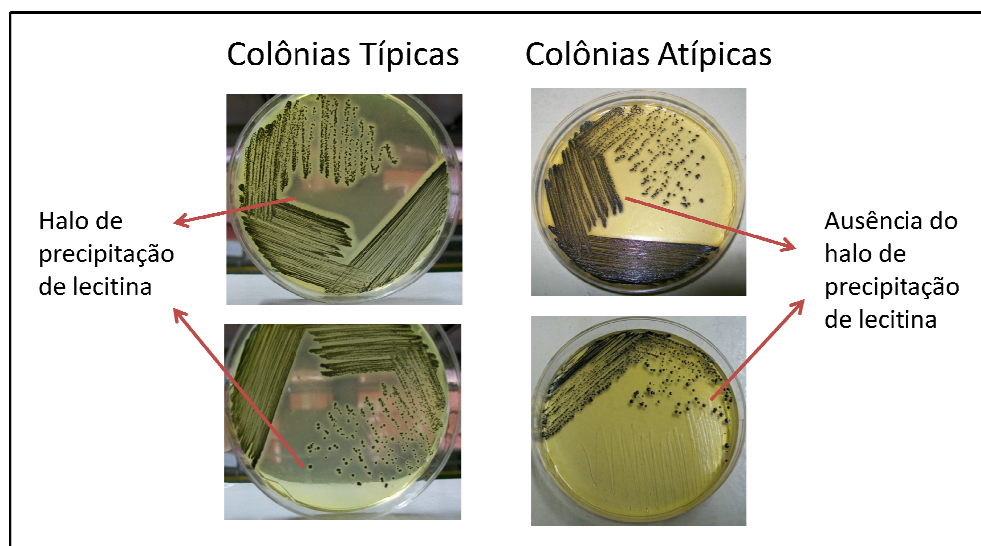


Figura 10. Diferenciação entre colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* (crescimento em meio Baird Parker).

3.2.2.2. Teste de Catalase

As colônias foram transferidas para tubos com ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Uma alçada de crescimento celular foi transferida para uma lâmina de microscopia previamente limpa com álcool à 70%, onde foram adicionadas gotas de solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil) à 3% (v/v), observando se ocorreu borbulhamento imediato (teste positivo) ou ausência de bolhas (teste negativo).

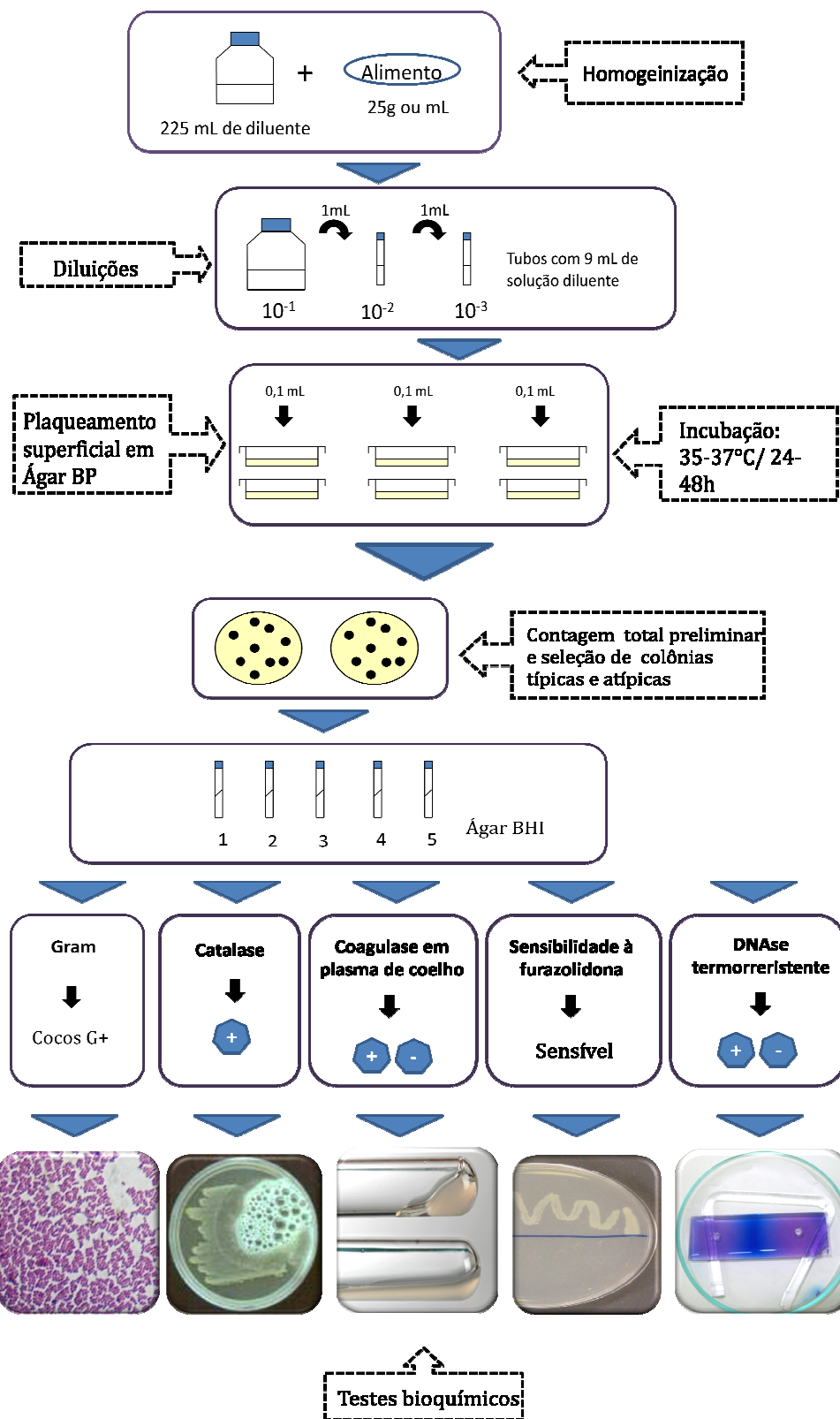


Figura 11. Procedimento de contagem e caracterização de *Staphylococcus* em alimentos.

3.2.2.3. Teste de Coagulase

As colônias isoladas foram transferidas para caldo BHI (Difco, EUA) e incubadas à 37°C por 24h. Após crescimento, foram transferidos 0,2 mL da cultura obtida em BHI para um tubo de 10x100 mm e em seguida adicionados 0,5 mL de Coagulase-Plasma-EDTA (Laborclin, Brasil), hidratado segundo instruções do fabricante, misturados com movimento de rotação, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Os tubos foram incubados à 37°C e observados a cada 1 hora, quanto à formação de coágulo. As reações 3+ e 4+ (**Figura 12**) foram consideradas positivas (*Staphylococcus* coagulase positiva).

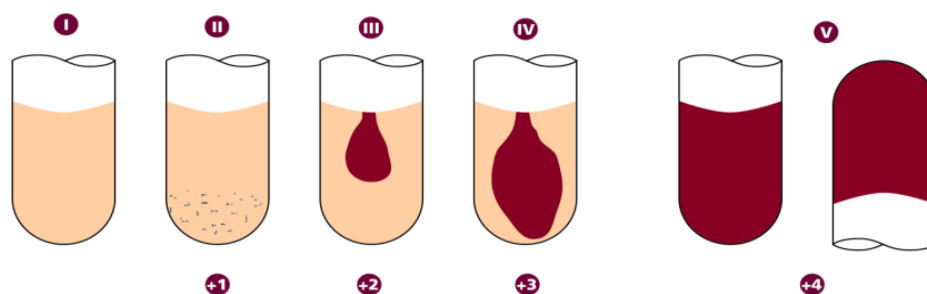


Figura 12. Reação do teste de coagulase para *Staphylococcus*.

Fonte: CANADA, 2002.

3.2.2.4. Teste de DNase

Este teste é específico como o teste de coagulase, porém menos subjetivo, pois envolve mudança de cor. Não é um substituto, mas um teste de apoio, especialmente para as reações 2+ no teste de coagulase. Lâminas recobertas com aproximadamente 3 mL de ágar DNA-azul de toluidina (formulado) foram preparadas e, após sua solidificação, foram feitos poços de 2 mm de

diâmetro, removendo o ágar por aspiração. O procedimento para realização do teste consiste de inoculação de algumas gotas de culturas líquidas (crescimento em caldo BHI por 24h) nestes poços e incubação à 37°C por 4h em câmara úmida. A cultura líquida inoculada deverá ser aplicada sem ser fervida em um dos poços e após fervura em um outro poço (teste de DNase termossensível e termorresistente). O desenvolvimento de um halo rosa brilhante que se estenda por pelo menos 1 mm indica uma reação positiva.

3.2.2.5. Teste de susceptibilidade à Furazolidona

Além das caracterizações descritas acima, para diferenciar os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* foi realizado o teste de susceptibilidade à etil-Furazolidona, segundo Von Rheinbaben; Hadlok (1981). O procedimento para realização do teste consiste de inoculação de uma alçada de culturas líquidas (crescimento em caldo BHI por 24h) em placas de ágar peptona (Difco, EUA) adicionado de furazolidona (Sigma, EUA), 20µg/ml e incubando-se a 37°C por 24-48h. Há apenas o crescimento de *Micrococcus* sp. neste meio, pois são resistentes à furazolidona.

3.3. Análises complementares

3.3.1. Identificação fenotípica das espécies isoladas

Um total de 111 isolados (27 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e 84 isolados coagulase negativa), selecionados aleatoriamente, caracterizados pelas análises do item 3.2.2., foram submetidos à caracterização

do perfil fenotípico de acordo com o Sistema *API-Staph* (bioMérieux, França), segundo instruções do fabricante, para uma possível identificação taxonômica das espécies.

Testes adicionais e complementares indicados pelo fabricante e segundo tabela de diferenciação entre espécies do gênero *Staphylococcus* (BANNERMAN, 2003) foram necessários para a identificação de algumas culturas, cujos resultados do *kit* geraram apenas uma boa identificação no gênero, resultando em perfis duvidosos quanto às espécies. Portanto, os isolados foram testados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos polimixina B 300U (Cefar, São Paulo, Brasil) e novobiocina 5µg (Laborclin, Paraná, Brasil) usando o método de disco-difusão no ágar Mueller-Hinton (Difco, EUA), segundo metodologia estabelecida pelo guia do “National Committee on Clinical Laboratory Standard” (NCCLS, 2003). O teste estabelece a inoculação de 3 a 5 colônias em caldo BHI, incubando à 35°C por de 2 a 6h, com o acompanhamento do crescimento através de escala de McFarland (Densimat, bioMérieux, França), com o intuito de padronizar a densidade do inóculo em 0,5, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A seguir, inoculou-se 0,1 mL em superfície de placas contendo ágar Muller-Hinton, espalhando-se bem para uma boa cobertura de toda a superfície. Após 2 a 3 minutos para secagem da superfície, aplicaram-se os discos antimicrobianos e o conjunto foi incubado à 37°C por 16-18h. Para a leitura dos resultados, os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro ou uma régua.

3.3.2. Avaliação de características de patogenicidade

3.3.2.1 Avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas

Para o teste de avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas em meio de cultura líquido, as 111 culturas foram cultivadas em 5 mL de caldo BHI

à 37°C por 24h, de onde foi retirada uma alíquota de 2 mL e adicionada a 23 mL de BHI, incubando-se em estufa sob agitação (New Brunswick Scientific, EUA) a 170 rpm e a 37°C por 48h (CHOU; CHEN, 1997; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002). As culturas foram centrifugadas (DuPont, EUA) a 9000xg por 10 min à temperatura de 4°C e uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi retirada e aplicada no barrete do *kit* VIDAS SET “Staph enterotoxin” (bioMérieux, França), tornando possível a detecção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE pelo aparelho mini VIDAS (bioMerieux, França), que apresenta sensibilidade de detecção de até 0,05 - 0,1ng de enterotoxina por mL de meio de cultura.

3.3.2.2. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas

3.3.2.2.1. Extração de DNA

Segundo metodologia adaptada de Martín; González-Hevia; Mendoza (2003) e Zourahova; Rysanek (2008), o DNA foi isolado a partir de 0,5 mL de culturas em caldo BHI incubadas por 16-18h à 37°C, sob agitação de 170 rpm. As células foram isoladas por centrifugação (Eppendorf), a 13000xg por 10 minutos e, após a retirada do sobrenadante, foram ressuspensas em 100 µL de Tris-EDTA buffer (10 mM Tris chloride, 1 mM EDTA [pH 8,0]) (formulado) e incubadas a 100°C (fervidas) por 20 minutos. Após serem novamente centrifugadas, seus sobrenadantes foram estocados à -20°C e posteriormente utilizados como DNA molde para a reação de PCR .

3.3.2.2.2. Reação em cadeia da Polimerase - Polimerase chain reaction (PCR)

Para a detecção dos cinco genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE foram realizados PCRs simples (Uniplex PCR). A metodologia e o desenho dos *primers* foram baseados no trabalho de Mehrotra; Wang; Johnson (2000), com algumas modificações e adaptações quanto ao volume final da reação, temperatura de anelamento e tempo dos ciclos. As culturas de referência de *S. aureus* utilizadas como controles positivos estão listadas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Culturas de referência utilizadas como controles positivos para detecção de enterotoxinas e genes codificadores.

Coleção	Número	Espécie	Enterotoxina produzida
ATCC	13565 ^a	<i>S. aureus</i>	SEA
ATCC	14458 ^b	<i>S. aureus</i>	SEB
FRI	1230 ^c	<i>S. aureus</i>	SEC
ATCC	23235 ^b	<i>S. aureus</i>	SED
ATCC	27664 ^a	<i>S. aureus</i>	SEE

*Culturas gentilmente cedidas por: ^aLaboratório de Higiene, FEA, UNICAMP; ^bColeção de culturas da Fiocruz; ^cCultura estoque própria (Laboratório de Toxinas Microbianas, FEA, UNICAMP).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo PCR buffer 1x (100 mM Tris-HCl, [pH 8,3], 500 mM KCl) (LGC); 1,5 mM MgCl₂ (LGC); 200 µM de dNTPs (Fermentas); 20 pmol dos primers (LGC) específicos para cada gene (**Tabela 11**); 0,5U de Taq DNA Polimerase (LGC) e 1µL de DNA (solução obtida com o procedimento de extração). O volume final foi ajustado adicionando-se água ultra pura estéril.

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador Mastercycler epgradientS 534 (Eppendorf) utilizando-se os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto); extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 11. Sequências de oligonucleotídeos dos primers utilizados durante reação de PCR.

<i>Primers*</i>	Sequências de oligonucleotídeos (5' - 3')	Tamanhos dos produtos amplificados (pb^a)
sea₁	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102
sea₂	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	
seb₁	GTATGGTGGTGTAAGTACG	164
seb₂	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	
sec₁	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451
sec₂	CACACTTTTAGAATCAACCG	
sed₁	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	278
sed₂	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	
see₁	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	209
see₂	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	

* Mehrotra; Wang; Johnson (2000).

^a pares de bases.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 2% (m/v) através do sistema de eletroforese horizontal submersa, corados com *Syber Safe* (Invitrogen), na concentração de 0,1 µL/mL, por aproximadamente 15 minutos, visualizados e fotografados em transiluminador de UV com fotodocumentador (Kodak). Marcadores de peso molecular foram incluídos em cada gel (100bp DNA ladder; Invitrogen).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Micrococcus* sp. nos alimentos

Foram consideradas contagens preliminares aquelas que foram realizadas nas placas com ágar BP a partir das diluições seriadas das 104 amostras de produtos lácteos. As contagens médias realizadas estão apresentadas na **Tabela 12**.

Tabela 12. Contagem preliminar média de população de *Staphylococcus* presente nas amostras analisadas.

Produto (nº amostras)	Contagem média (UFC/g)
Sorvete (24)	5×10^3
Creme de leite (20)	$2,9 \times 10^5$
Patê (20)	$6,2 \times 10^3$
Queijo Minas meia cura (20)	$6,4 \times 10^5$
Queijo Minas frescal (20)	$6,6 \times 10^5$

A média das contagens foi elevada para os 5 produtos analisados e observaram-se números mais expressivos nas amostras de queijos. As contagens variaram de $1,0 \times 10^2$ UFC/g a $3,4 \times 10^4$ UFC/g em sorvetes, de $5,0 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^4$ UFC/g em patês, $3,5 \times 10^3$ UFC/g a $2,6 \times 10^6$ UFC/g em queijos Minas meia cura e de $1,5 \times 10^3$ UFC/g a $3,5 \times 10^6$ UFC/g em queijos Minas frescal. Houve crescimento e contagem em apenas uma amostra de creme de leite pasteurizado

($2,9 \times 10^5$ UFC/g). Valores de contagens a partir de 10^5 UFC/g são considerados de risco à possível produção de enterotoxinas estafilocócicas.

Os isolados obtidos e selecionados a partir das contagens preliminares nas placas de ágar BP que passaram por testes confirmatórios de Gram e catalase foram submetidos aos testes de coagulase, DNase e susceptibilidade à furazolidona.

Através dos resultados obtidos no teste de susceptibilidade à furazolidona separaram-se isolados de dois gêneros distintos (*Micrococcus* sp. e *Staphylococcus* sp.) que cresceram de forma semelhante no meio de cultura BP. Do total de isolados, 16,4% (29/177) cresceram no ágar peptona furazolidona e foram classificados como *Micrococcus* sp. (resistentes ao antibiótico) e 83,6% (148/177) foram classificados como *Staphylococcus* sp. (sensíveis ao antibiótico).

Vargun; Vatansever (2007), através do mesmo teste, encontraram a frequência de 6,2% dos isolados sendo *Micrococcus* sp. em amostras de leite e creme de leite, valor mais baixo que o encontrado neste trabalho, comprovando que nas amostras analisadas prevaleciam as deficiências higiênico-sanitárias e provavelmente abusos de temperatura durante transporte e armazenamento que incrementaram a incidência dos grupos.

Esper (2006), no entanto, encontrou uma porcentagem alta de *Micrococcus* sp. em amostras de ricota, totalizando 62,6% de seus isolados. São poucos os trabalhos que fazem esta diferenciação entre *Staphylococcus* sp. e *Micrococcus* sp., sendo de caráter indispensável devido à extrema semelhança bioquímica entre os dois gêneros, o que pode conduzir a identificações errôneas.

Entre os isolados confirmados como *Staphylococcus* sp., 74,3% (110/148) eram coagulase negativa e 25,7% (38/148) eram coagulase positiva, segundo resultados do teste de coagulação em plasma de coelho. Os isolados coagulase positiva foram obtidos apenas a partir das amostras de queijos, já os isolados dos demais alimentos analisados foram todos negativos no teste de coagulase. Neste sentido, Vargun; Vatansever (2007) avaliaram diferentes tipos de plasma para o teste de coagulase em isolados de *Staphylococcus* obtidos de leite e creme, detectaram variações de 13,7% a 23,7% de *Staphylococcus*

coagulase positiva (SCP) e de 76,3% a 86,3% de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) em leites; já nos cremes de leite a variação foi de 17,3% a 21,2% de SCP e 78,8% a 82,7% de SCN, indicando a predominância de SCN nos dois alimentos. Esses valores foram semelhantes aos encontrados nos derivados do leite analisados nesta pesquisa. Em adição, Pelisser *et al.* (2009), analisando queijos, observaram a frequência de 30,2% de SCP e 69,8% de SCN.

Stamford *et al.* (2006), pelo contrário, encontraram maior número de SCP (70,6%) do que de SCN (29,4%) em leite *in natura*. Esse resultado pode ser atribuído à incidência de mastite bovina no rebanho leiteiro. Por outro lado, Cunha Neto; Silva; Stamford (2002) verificaram que 100% de seus isolados de leite em pó e queijo de coalho eram coagulase positiva.

A prevalência da presença de SCN em derivados do leite e o estudo de seu potencial patogênico não têm sido claramente correlacionados, mas isto se torna cada vez mais necessário para avaliar a segurança microbiológica destes produtos (IRLINGER, 2008).

Os resultados dos testes de sensibilidade à furazolidona e coagulase podem ser observados na **Figura 13**.

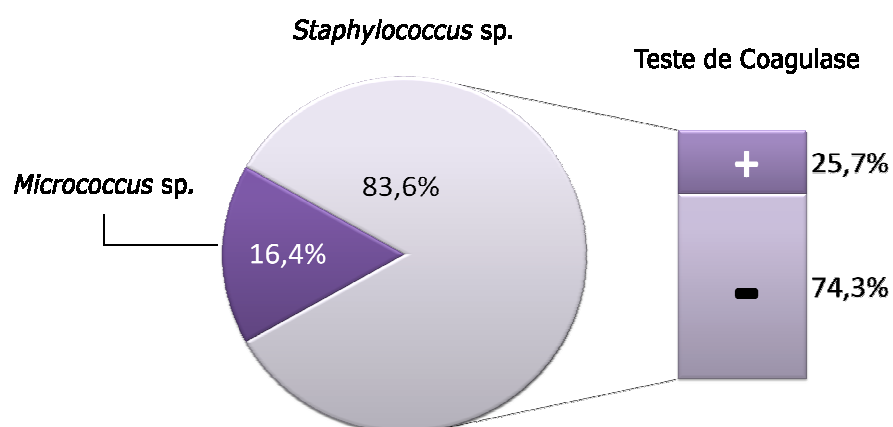


Figura 13. Porcentagem de *Micrococcus* e *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isolados de derivados do leite.

Houve detecção de colônias no meio BP (contagem preliminar) em 43,3% (45/104) das amostras, sendo encontradas em 62,5% de amostras de queijos (25/40), em 66,6% de sorvetes (16/24), em 15% de patês à base de queijo (3/20) e em 5% das amostras de cremes de leite pasteurizados (1/20). Após diferenciação dos isolados, observou-se que *Micrococcus* foram detectados em 10,6% (11/104) das amostras dos produtos analisados, sendo uma de sorvete (4,2%), 5 de queijos Minas meia cura (25%) e 5 de queijos Minas fescal (25%). *Staphylococcus* coagulase positiva foram isolados em 11,5% (12/104) das amostras, sendo 3 de queijo Minas frescal (15%) e 9 de queijo Minas meia cura (45%). *Staphylococcus* coagulase negativa foram encontrados em 38,5% (40/104) das amostras, sendo em 16 sorvetes (66,6%), em um creme de leite (5%), em 3 patês (15%), em 8 queijos Minas frescal (40%) e em 12 queijos Minas meia cura (60%). As frequências de amostras contaminadas estão apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 13. Frequência de amostras de derivados lácteos contaminadas por *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

Alimento	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras contaminadas	Frequência de amostras contaminadas (%)
Sorvete	24	16	66,7
Creme de leite	20	1	5
Patê	20	3	15
Queijo Meia cura	20	14	70
Queijo Minas frescal	20	11	55
TOTAL	104	45	43,3

Existem diversas pesquisas sobre a ocorrência de SCP e *S. aureus* em alimentos derivados do leite, porém são poucas as que verificam a presença de SCN.

O queijo Minas frescal é um produto de alto teor de umidade e, portanto, um meio favorável ao desenvolvimento de bactérias patogênicas, principalmente do gênero *Staphylococcus*. Almeida Filho; Nader Filho (2000), em Minas Gerais, identificaram *S. aureus* em 50% (40/80) dos queijos analisados; Araújo *et al.* (2002), no Rio de Janeiro, detectaram a presença de *S. aureus* em 20% (9/45) das amostras de queijo Minas frescal e *Staphylococcus* sp. em 77,7% (35/45) das amostras. Salotti *et al.* (2006), em Jaboticabal-SP, detectaram presença de *Staphylococcus* sp. em 15% (9/60) das amostras de queijos; André *et al.* (2008), em Goiás, isolaram *S. aureus* em 70,8% (17/24) das amostras. Carvalho; Viotto; Kuaye (2007), em Campinas-SP, isolaram SCP em 12,9% (4/31) das amostras, sendo este resultado muito semelhante ao do presente estudo. Aragon-Alegro *et al.* (2007) analisaram queijos frescal e curados e isolaram SCP em 69% (9/13) dos queijos frescal, 100% (3/3) dos queijos curados, sendo semelhante a este estudo a obtenção de uma frequência maior de SCP nos queijos curados do que nos queijos Minas frescal.

Outros tipos de queijos também foram avaliados quanto à presença de *Staphylococcus*. Borelli *et al.* (2006), em Minas Gerais verificaram que 70% dos queijos tipo Canastra estavam contaminados com *S. aureus*, sendo que em todos os queijos detectou-se *Staphylococcus* sp. Borges (2006), em Fortaleza, detectou SCP em 100% (25/25) das amostras de leite cru e em 8% (2/25) dos queijos em uma linha de produção de queijo de coalho. Analisando ricotas comercializadas em Campinas, Esper (2006) constatou a presença de SCP em 4,4% (2/45) das amostras. Já Akineiden *et al.* (2008) avaliaram a presença de SCP em queijos produzidos a partir de leite de cabra na Alemanha e observaram frequência de 7,7% (14/181) de queijos contaminados.

Huong *et al.* (2010), no Vietnam e Aragon-Alegro *et al.* (2007), no Brasil verificaram que 25% (3/12 e 6/24) dos sorvetes analisados estavam contaminados por *S. aureus* e SCP, respectivamente, ao contrário do presente estudo que

apenas detectou presença de SCN nos sorvetes investigados. O Programa Paulista 2002 (SÃO PAULO, ESTADO, 2003) analisou sorvetes de massa à base de leite e 10,6% (14/132) das amostras apresentavam *S. aureus*.

A contaminação dos derivados do leite muitas vezes está diretamente relacionada com a qualidade matéria-prima, especialmente quando não há tratamento térmico do leite. Zouharova; Rysanek (2008), na República Tcheca, relataram frequência de 15,9% (70/440) de SCP em amostras de leite. No Sudão, Shuiep (2009) analisaram leite de camelo e constataram que 8,8% (28/320) de amostras estavam contaminadas com *S. aureus*. Huong *et al.* (2010), no Vietnã, verificaram que 35,4% (17/48) dos leites analisados possuíam *S. aureus*.

Além de sorvetes e queijos, Aragon-Alegro *et al.* (2007) analisaram leites e sobremesas comercializados em Botucatu-SP, e obtiveram contagens de SCP em 36,5% das sobremesas e em 100% dos leites.

Cunha *et al.* (2006), Esper (2006) e Borges (2006) realizaram detecção de SCN em derivados lácteos. Cunha *et al.* (2006) detectaram SCN em 22,7% (20/88) das amostras de doces de padaria, leites, queijos brancos, entre outros comercializados em Botucatu-SP. Esper (2006) constatou a presença de SCN em 51,1% (23/45) amostras de ricota. Borges *et al.* (2008) isolaram SCN em uma linha de produção de queijo coalho e sua população variou de <1 UFC/mL, no leite pasteurizado a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL no leite cru.

Acredita-se que as diferenças de frequência de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa encontrados possam ser atribuídas às diferentes formas de cuidados higiênicos na obtenção de matéria-prima e na execução do processo de fabricação, bem como ao tempo e abusos na temperatura de conservação durante transporte e comercialização. A realização de comparações entre resultados é difícil, pois a presença de *Staphylococcus* provém de mastites subclínica, manuseio do animal durante a ordenha e condições higiênicas de processamento, que variam de local a local (FAGUNDES *et al.*, 2010).

Após diferenciação dos isolados entre *Staphylococcus* sp. e *Micrococcus* sp. e entre SCP e SCN, pôde-se realizar a contagem específica de

cada grupo a partir da contagem preliminar realizada nos alimentos. Estas contagens médias estão demonstradas na **Tabela 14**.

Tabela 14. Contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), negativa (SCN) e *Micrococcus* sp. em produtos derivados do leite.

Produto (nº amostras)	Contagem (UFC/g)		
	SCN	SCP	<i>Micrococcus</i> sp.
Sorvete (24)	5×10^3	-	50
Crema de leite (20)	$2,9 \times 10^5$	-	-
Patê (20)	$6,2 \times 10^3$	-	-
Queijo Minas meia cura (20)	$3,9 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
Queijo Minas frescal (20)	$3,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Huong *et al.* (2010) analisaram sorvetes, e detectaram *S. aureus* em apenas 25% (3/12) das amostras, com contagens variando de 10 a 10^2 UFC/g. Analisando o mesmo produto, Aragon-Alegro *et al.* (2007) também identificaram SCP em 25% (6/24) de amostras, com contagens acima dos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

Neste trabalho, mesmo não tendo sido isolado SCP nos sorvetes analisados, foi constatada elevada população de SCN (10^4 UFC/g) e 66,7% (16/24) das amostras estavam contaminadas. Esta quantidade é excessiva e causa preocupações quanto à segurança do consumo destes produtos, pois SCN já foram associados a surtos de intoxicação alimentar. A frequência de SCN nos sorvetes foi ainda maior do que nos queijos estudados, produtos onde é mais comum o relato de presença destas bactérias.

No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos estabelecidos pela RDC Nº12/2001 da ANVISA, determinam limites apenas para contagem de

Staphylococcus coagulase positiva (BRASIL, 2001). Desta forma, a grande maioria dos trabalhos brasileiros relacionados às bactérias do gênero *Staphylococcus* apenas estuda *S. aureus* e SCP, sendo este um dos principais diferenciais desta pesquisa.

Apesar do gênero *Staphylococcus* ter sido detectado em apenas uma amostra de creme de leite pasteurizado, as contagens alcançaram a 10^5 UFC/g, indicando uma falha no processamento térmico ou uma contaminação pós-pasteurização seguida de abusos de temperaturas de estocagem, estimulando a proliferação do micro-organismo no alimento. Além deste alto valor de contagem no creme de leite, foram alcançadas contagens de 10^6 UFC/g em algumas amostras de queijos (valores considerados suficientes para possíveis produções de enterotoxinas). Esta contaminação pode ser atribuída à prevalência, principalmente de *S. aureus* como agente etiológico da mastite bovina, a ubiquidade deste patógeno na natureza e a não adoção das Boas Práticas de Fabricação na obtenção higiênica do leite, desde a ordenha até sua recepção no laticínio, o que representa um fator de risco aos consumidores e explicita a necessidade de uma maior atenção ao controle higiênico-sanitário no processamento destes produtos.

Os queijos foram os produtos com a pior qualidade microbiológica (relacionada com a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa), sendo sua contagem mínima de 10^3 UFC/g e com grande parte das amostras (56% ou 14/25) apresentando contagens $>10^5$ UFC/g, valor considerado de risco para produção de enterotoxinas.

Nos patês, mesmo havendo contagens em apenas 3 amostras, em duas delas os números foram relevantes (10^3 e 10^4 UFC/g), acima do limite estabelecido pela legislação.

Na **Figura 14** estão apresentadas faixas de contagem de *Staphylococcus* constatadas em cada amostra dos produtos analisados. A seguir (**Tabela 15**), encontram-se as variações das contagens de *Staphylococcus* detectadas nas amostras de derivados lácteos.

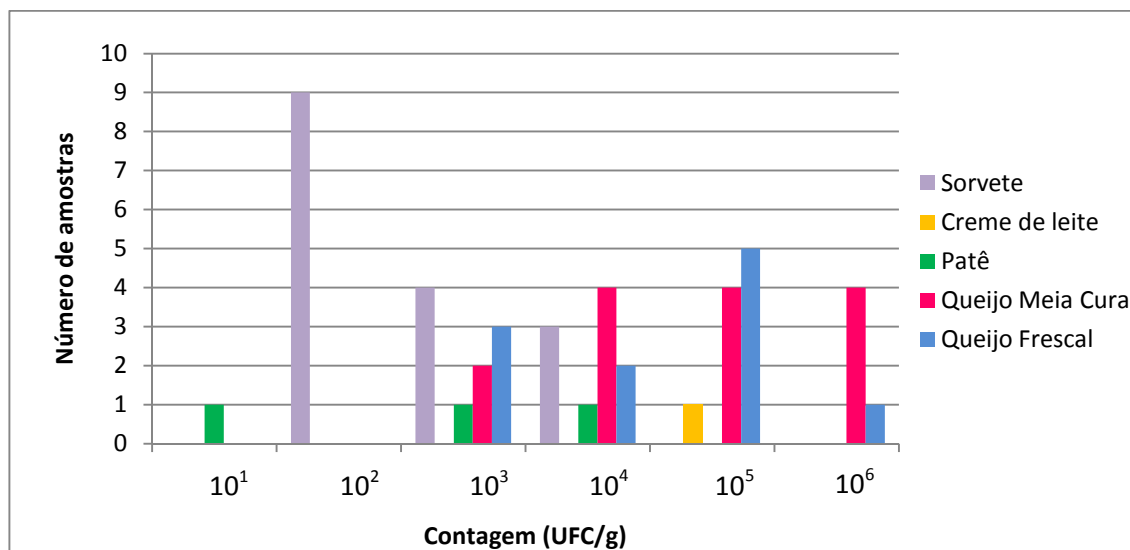


Figura 14. Distribuição de amostras de produtos derivados do leite conforme faixa de contagem de *Staphylococcus* sp.

Tabela 15. Variações das contagens de *Staphylococcus* nos produtos lácteos analisados.

Produto	Nº amostras	Variação da contagem de <i>Staphylococcus</i> (UFC/g)
Sorvete	9	$1,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^2$
	4	$1,9 \times 10^3 - 8,8 \times 10^3$
	3	$1,3 \times 10^4 - 3,4 \times 10^4$
Creme de leite	1	$2,9 \times 10^5$
Patê	1	$5,0 \times 10^1$
	1	$5,5 \times 10^3$
	1	$1,3 \times 10^4$
Queijo MC	2	$3,5 \times 10^3 - 8,6 \times 10^3$
	4	$1,1 \times 10^4 - 6,7 \times 10^4$
	4	$2,2 \times 10^5 - 8,8 \times 10^5$
	4	$1,0 \times 10^6 - 2,6 \times 10^6$
Queijo MF	3	$1,5 \times 10^3 - 7,9 \times 10^3$
	2	$2,7 \times 10^4 - 7,3 \times 10^4$
	5	$5,0 \times 10^5 - 7,0 \times 10^5$
	1	$3,5 \times 10^6$
TOTAL	45	

Na **Tabela 16** estão apresentados os limites determinados pela legislação brasileira (apenas para SCP) e o número de amostras que se apresentaram em desacordo com a norma, ultrapassando os limites específicos para cada tipo de derivado do leite.

A presença de SCP foi detectada em 30% (12/40) das amostras de queijos Minas meia cura e Minas frescal. Todas as amostras (12/12) apresentaram contagens acima do limite permitido, o que torna preocupante o consumo desses queijos e revela a baixa qualidade higiênico-sanitária desses produtos.

Tabela 16. Frequência de amostras com contagens acima dos limites estabelecidos pela RDC 12/2001 para *Staphylococcus coagulase positiva*.

Alimento	Limite* (UFC/g)	Amostras positivas para SCP (%)	Amostras com contagens de SCP acima do limite (%)
Sorvete	5×10^2	0/24 (0)	0
Creme de leite	10^2	0/20 (0)	0
Patê	10^3	0/20 (0)	0
Queijo Meia cura	10^3	9/20 (45)	9/9 (100)
Queijo Minas frescal	10^3	3/20 (15)	3/3 (100)

*RDC Nº12/2001, Anvisa (Brasil, 2001).

Salotti *et al.* (2006) analisaram queijos Minas frescal e observaram contagens $<1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/g, sendo que 15% (9/60) das amostras apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Carvalho; Viotto; Kuaye (2007) avaliaram o mesmo produto e observaram que 7,5% (4/31) das amostras apresentavam contagens excessivas, segundo a legislação, frequência menor do que a encontrada no presente trabalho. Já André *et al* (2008) e Komatsu *et al.* (2010) obtiveram resultados mais

expressivos, chegando a 54,2% (13/24) e 88% (44/50) do total de amostras de queijos Minas frescal com contagens acima dos limites permitidos, respectivamente.

Esper (2006) realizou contagens de SCP e SCN em ricotas e relatou números que variaram de 10^2 a 10^6 UFC/g, porém apenas 2,2% (1/45) das amostras estavam acima dos limites estabelecidos para o alimento (5×10^2 UFC/g) (BRASIL, 2001).

Na Itália, Poli *et al.* (2007) analisaram queijos locais (tipo Monte Veronese) e constataram que 78% (36/46) das amostras apresentavam contagens acima do limite local. Já Pelisser *et al.* (2009) detectaram que 63,3% (19/30) dos queijos americanos e coloniais apresentavam SCP, sendo que em 28,8% (5/19) dos produtos, as contagens foram maiores que 10^3 UFC/g, limite máximo estipulado pela legislação (BRASIL, 2001).

Na Alemanha, Akineiden *et al.* (2008) estudaram queijos feitos a partir de leite de cabra e obtiveram contagens de 3×10^1 a $8,6 \times 10^5$ UFC/g.

Borges *et al.* (2008) analisaram *Staphylococcus* sp. em queijos de coalho de uma linha de produção. As contagens médias oscilaram de $9,8 \times 10^1$ a $2,6 \times 10^3$ UFC/g de SCN em cinco lotes e de $1,9 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^2$ UFC/g de SCP em dois lotes, ultrapassando os limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

O presente estudo e diversos outros citados confirmam a grande quantidade de queijos impróprios para o consumo que são produzidos atualmente, descaso de medidas de higiene e possíveis falhas nos procedimentos de limpeza e sanitização de linhas de produção, no controle da matéria-prima e na atenção ao processamento térmico necessário para a produção destes alimentos, além de possíveis abusos de temperatura praticados tanto no transporte quanto na estocagem do produto, que são agentes incrementadores dos níveis de contaminação. Os cuidados higiênico-sanitários, a realização de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e aplicação de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) durante a produção e comercialização destes alimentos é de

extrema importância e necessidade, além de uma maior rigidez na fiscalização destes alimentos.

4.2. Análises complementares

A partir dos isolados confirmados como *Staphylococcus* sp., cocos Gram positivos, catalase positivos, DNase positivos e negativos, coagulase positivos e negativos, foram escolhidos aleatoriamente 111 isolados para análises posteriores de identificação taxonômica de espécies e de produção de enterotoxinas, seguindo aproximadamente a proporção de coagulases positivos e negativos encontrados, resultando na escolha de 27 *Staphylococcus* coagulase positiva e 84 *Staphylococcus* coagulase negativa.

4.2.1. Identificação fenotípica de espécies

Os resultados obtidos quanto às diferentes espécies de *Staphylococcus*, identificadas através do sistema de testes bioquímicos em miniatura *API-Staph* (bioMérieux-SA) e através de testes adicionais de susceptibilidade aos antibióticos polimixina B e novobiocina, estão indicados na **Figura 15**.

O sistema *API-Staph* mostrou-se bastante eficiente para identificação das espécies *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. auricularis* e *S. lentus*, *S. epidermidis* e *S. cohnii*. Entretanto, possui uma base com número de espécies restrito, devido à alta diversidade de espécies de *Staphylococcus* já descritas, havendo necessidade, em alguns casos, de recorrer a testes bioquímicos tradicionais para uma melhor e mais confiável caracterização da espécie. Esta limitação encontrada é corroborada por outros estudos (BORGES, 2006; PEREIRA, 2006).

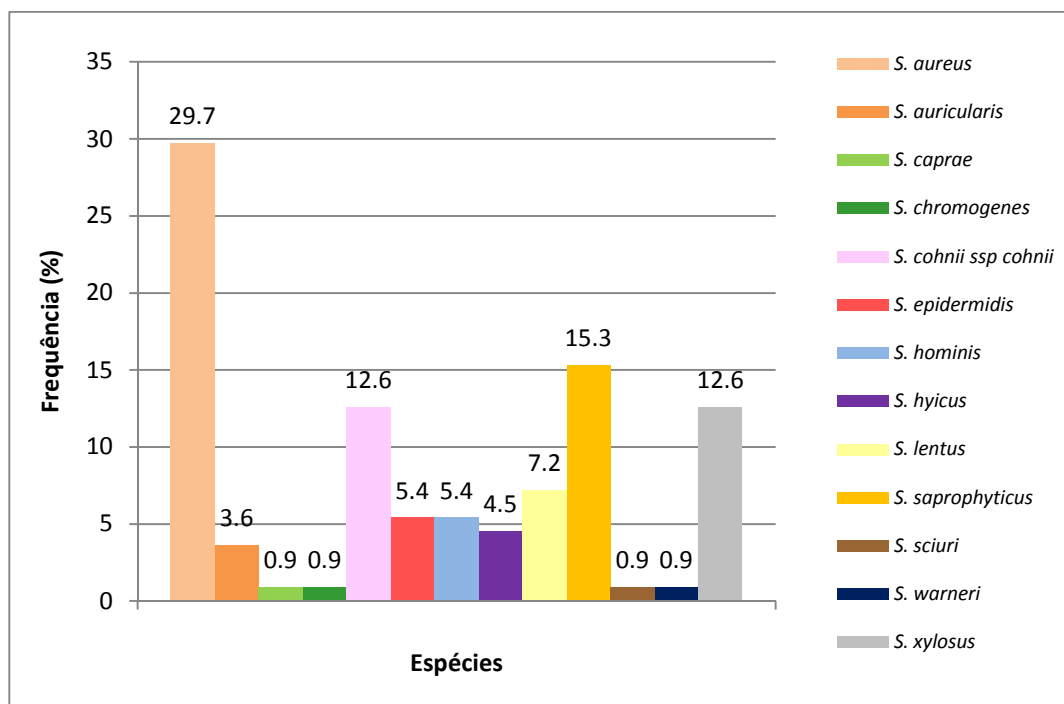
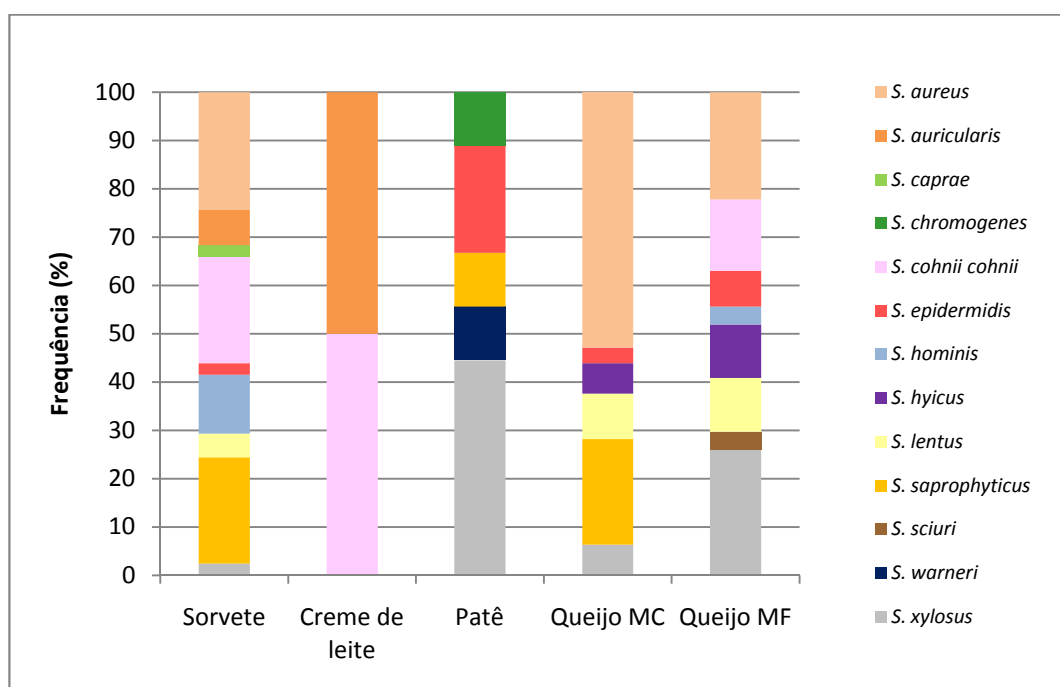


Figura 15. Frequência de espécies do gênero *Staphylococcus* isoladas em produtos derivados do leite.

Com a complementação de testes de susceptibilidade a antibióticos, foram identificadas 13 espécies diferentes de *Staphylococcus* nos alimentos: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii ssp cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*. Uma predominância de *S. aureus* foi observada, compreendendo 29,7% do total de isolados. Outras espécies que foram encontradas com maior frequência nos derivados lácteos analisados foram *S. saprophyticus* (15,3%), *S. cohnii ssp cohnii* (12,6%) e *S. xylosus* (12,6%). As demais espécies variaram de 0,9% a 7,2% de frequência.

A microbiota de *Staphylococcus* presente em cada tipo de alimento analisado (**Figura 16**) apresentou uma grande diversidade de espécies. O maior número de espécies foi detectado no sorvete (9 espécies), seguido do queijo Minas frescal (8 espécies), queijo Minas meia cura (6 espécies), patê (5 espécies) e apenas 2 espécies no creme de leite. Nas amostras de sorvetes houve a

predominância de *S. aureus* (24,4%), *S. saprophyticus* (22%) e *S. cohnii* ssp *cohnii* (22%). No creme de leite pasteurizado só foram identificadas duas espécies, *S. auricularis* (50%) e *S. cohnii* ssp *cohnii* (50%). No patê a predominância foi de *S. xylosus* (44,4%), seguido de *S. epidermidis* (22,2%). No queijo Minas meia cura (MC) houve grande prevalência de *S. aureus* (53,1%), seguido de *S. saprophyticus* (21,9%) e no queijo Minas frescal (MF) a espécie mais frequente foi *S. xylosus* (25,9%), seguida de *S. aureus* (22,2%).



MC= Minas meia cura

MF= Minas frescal

Figura 16. Frequência de espécies de *Staphylococcus* por alimento analisado.

Constatou-se uma relação de proporção, ou seja, quanto maior o número de amostras contaminadas (como é o caso dos sorvetes), maior o número de espécies encontradas. Como apenas uma amostra de creme de leite estava contaminado com o gênero *Staphylococcus*, apenas 2 espécies foram identificadas neste produto. Porém, mesmo tendo sido detectadas apenas 3

amostras de patê contaminadas com *Staphylococcus*, foram identificadas cinco espécies, apenas uma espécie a menos do que as encontradas nas 14 amostras de queijo Minas meia cura.

São poucos os trabalhos nos quais há a realização da identificação de espécies, especialmente devido à grande maioria apenas estudar *S. aureus* ou SCP em alimentos. Laboratórios de rotina também não costumam identificar as espécies de SCN. No entanto, a identificação bacteriológica exata de espécies ou subespécies é necessária para uma melhor qualidade de investigações epidemiológicas, para avaliar o seu significado patogênico e planejar a gestão de práticas específicas (IRLINGER, 2008). Neste sentido, Lamaita *et al.* (2005) identificaram 8 espécies de *Staphylococcus* em amostras de leite cru e *S. aureus* foi a espécie mais frequente (34,6%), seguida de *S. hyicus* e *S. epidermidis*. Shimamura; Kidokoro; Murata (2006) detectaram *S. warneri* em maior frequência em sobremesas japonesas (40,2%), seguido de *S. aureus* (15,2%). Stamford *et al.* (2006) detectaram em leite *in natura* 3 espécies coagulase positivas e 5 espécies coagulase negativas, com predominância de *S. aureus*, seguido de *S. intermedius*. Cunha *et al.* (2006) identificaram *S. apidermidis*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. sacharolyticus* em doces de padaria, leite e queijos.

Borges (2006) identificou 12 espécies (9 SCN e 3 SCP) em uma linha de produção de queijo de coalho. *S. aureus* foi constatado em 12% (3/25) das amostras de queijo, além de 5 outras espécies com predominância de *S. epidermidis* e *S. xylosus* e 18% (17/102) dos isolados não apresentaram identificação conclusiva através do Sistema *API-Staph*.

No presente estudo também houve dificuldades com a identificação bioquímica através do *kit API-Staph*, com 28,8% (32/111) dos isolados sem identificação conclusiva de espécie, apenas conclusiva para o gênero, necessitando-se fazer repetições e realizar testes adicionais para se conseguir uma boa identificação de espécies (alto índice de convergência). Análises moleculares para a caracterização das espécies seriam interessantes neste caso, porém, não foram possíveis. Na **Tabela 17** são apresentados os números de isolados por espécie que tiveram a porcentagem de convergência fenotípica

superior a 75% nos testes do *API-Staph* para chegar a um resultado conclusivo, sem a necessidade de testes adicionais.

Tabela 17. Número de isolados e suas respectivas espécies identificadas com clareza através do *kit API-Staph* (bioMérieux).

Espécie (nº total de isolados)	Nº de isolados com boa identificação <i>API-Staph</i>* (%)
<i>S. aureus</i> (33)	27 (81,8)
<i>S. auricularis</i> (4)	4 (100)
<i>S. caprae</i> (1)	0 (0)
<i>S. chromogenes</i> (1)	1 (100)
<i>S. cohnii</i> (14)	8 (57,1)
<i>S. epidermidis</i> (6)	5 (83,3)
<i>S. hominis</i> (6)	0 (0)
<i>S. hyicus</i> (5)	4 (80)
<i>S. lentus</i> (8)	8 (100)
<i>S. saprophyticus</i> (17)	7 (41,2)
<i>S. sciuri</i> (1)	1 (100)
<i>S. warneri</i> (1)	1 (100)
<i>S. xylosus</i> (14)	13 (92,9)
TOTAL (111)	79 (71,2)

*Convergência de resultados $\geq 75\%$.

Segundo Irlinger (2008), *kits* comerciais baseados na discriminação fenotípica são rápidos, mas ainda não podem identificar com segurança os SCN devido à expressão variável de algumas características fenotípicas. Métodos genotípicos proporcionam melhores resultados em termos de reprodutibilidade e discriminação de espécies, porém grande parte dos trabalhos utilizam somente os *kits* comerciais para identificação de espécies de micro-organismos, especialmente por sua facilidade e rapidez.

Comparando-se os resultados da identificação de espécies com os resultados de testes de coagulase e DNase termorresistente (**Tabela 18**), notam-se três observações: a espécie *S. hyicus*, que já foi citada como sendo tanto coagulase positiva quanto negativa (STAMFORD *et al.*, 2006) aparece como coagulase negativa, porém com resultado positivo de DNase; 10 isolados de *S. aureus* com resultado negativo para coagulase, porém também negativos para DNase; 4 *S. xylosus* sendo coagulase positiva (normalmente citado como coagulase negativa), sendo também positivo no teste de DNase.

Tabela 18. Perfis de coagulase e DNase com relação às espécies de *Staphylococcus* identificadas.

Resultados dos testes		Espécies*	Número de isolados
Coagulase	DNase termorresistente		
Negativo	Positivo	<i>S. auricularis</i>	4
		<i>S. caprae</i>	1
		<i>S. cohnii ssp cohnii</i>	4
		<u><i>S. hyicus</i></u>	4
		<i>S. lentus</i>	1
		<i>S. saprophyticus</i>	2
		<i>S. warneri</i>	1
		<i>S. xylosus</i>	3
Negativo	Negativo	<u><i>S. aureus</i></u>	10
		<i>S. saprophyticus</i>	15
		<i>S. hominis</i>	6
		<i>S. cohnii ssp cohnii</i>	10
		<i>S. epidermidis</i>	6
		<i>S. lentus</i>	7
		<i>S. xylosus</i>	7
		<i>S. chromogenes</i>	1
		<i>S. sciuri</i>	1
		<i>S. hyicus</i>	1
Positivo	Positivo	<i>S. aureus</i>	23
		<u><i>S. xylosus</i></u>	4
Positivo	Negativo	-	0
TOTAL			111

*identificadas pelo API-Staph.

Segundo tabela de identificação de *Staphylococcus* sp. de Bannerman (2003), 90% ou mais de *S. aureus* testados são coagulase positivos e DNase positivos. Já *S. hyicus* variam de 11% a 89% coagulase positivos e acima de 90% DNase positivos e *S. xylosus* aparecem acima de 90% como coagulase e DNase negativos. Neste trabalho, 30,3% dos *S. aureus* identificados pelo *API-Staph* eram coagulase e DNase negativos, uma frequência mais alta do que a exposta por Bannerman (2003). Alguns isolados identificados como *S. xylosus* também aparecem com os resultados de coagulase e DNase como a menor porcentagem encontrada por Bannerman (2003). Estas análises apenas confirmam a dificuldade em se utilizar somente a identificação fenotípica de espécies para micro-organismos, reafirmando a importância de outros métodos para haver uma maior garantia dos resultados.

Quanto à relação entre a produção das duas enzimas analisadas, pôde-se verificar no presente estudo a possível produção de DNase sem haver produção de coagulase, porém o inverso não foi observado, não havendo nenhum isolado produtor de coagulase e não produtor de DNase.

Outro fator questionável nos estudos com *Staphylococcus* sp. é o crescimento das colônias típicas e atípicas no meio BP. A princípio, consideravam-se apenas as colônias típicas como sendo possivelmente coagulase positivas e DNase positivas, porém não é o que normalmente se observa (**Figura 17**).

Entre os isolados coagulase negativa detectados neste estudo, 14,3% (12/84) eram colônias com crescimento típico em ágar BP e, entre elas, 4 eram DNase positivas, as demais eram todas DNase negativas (8 colônias típicas e 72 atípicas). Entre os isolados coagulase positiva, 81,5% (22/27) eram típicas e 18,5% (5/27) atípicas, sendo que todas eram Dnase positivas, tanto as típicas quanto as atípicas. De 34 colônias típicas relacionadas, apenas 22 foram caracterizadas como *S. aureus*. Sob mesmo enfoque, Viçosa *et al.* (2010) estudaram diferentes meios de isolamento de *Staphylococcus* sp. em amostras leite cru e queijo, entre eles o meio Baird-Parker. Das colônias típicas detectadas neste meio, 59% (36/61) eram coagulase positiva e 41% (25/61) coagulase

negativa, e entre as colônias atípicas encontradas, 19,5% (33/169) eram coagulase positiva e 80,5% (136/169) coagulase negativa.

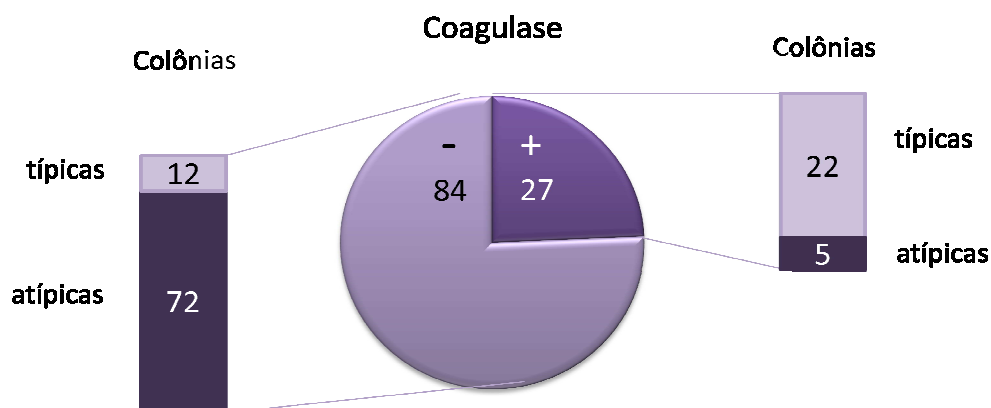


Figura 17. Relação entre colônias típicas e atípicas, coagulase positivas e negativas isoladas em meio BP, a partir de produtos derivados do leite.

Similarmente, Esper (2006) constatou que 4 isolados coagulase positiva encontrados em ricotas apresentavam características atípicas de colônias em meio BP. Nascimento; Corbia; Nascimento (2001) também constataram que *Staphylococcus* coagulase positiva, incluindo *S. aureus*, podem apresentar crescimento não característico, levando a falhas na quantificação destas bactérias no meio de cultura específico, sendo de extrema importância a realização de testes bioquímicos confirmatórios, especialmente a técnica de Gram.

Segundo Bennett (1996), sete colônias atípicas recuperadas em ágar BP foram produtoras de enterotoxinas SEA, SEB e SEC, e algumas destas, também foram coagulase, lisozima e termonuclease negativa, demonstrando que o comportamento metabólico destes microrganismos pode variar, mas mesmo assim, continuam com a capacidade de produzir enterotoxinas.

Portanto, *Staphylococcus* enterotoxigênicos e não enterotoxigênicos podem apresentar resultados semelhantes quanto à formação de colônias típicas e atípicas em BP e quanto à produção ou não de coagulase (BENNETT, 1996).

4.2.2. Avaliação de características de patogenicidade

Quanto à produção de enterotoxinas pelos 111 isolados analisados, apenas um (0,9%) apresentou resultado positivo através do VIDAS SET “Staph enterotoxin” (bioMérieux-SA). O isolado foi identificado como *S. aureus*, coagulase positiva, proveniente de queijo Minas meia cura, cuja contagem de *Staphylococcus* sp. foi de $1,9 \times 10^6$ UFC/g ($1,5 \times 10^6$ UFC/g de SCP e $3,8 \times 10^5$ UFC/g de SCN) considerada alta o suficiente para a possível produção de enterotoxinas no alimento. O RFV (Valor Relativo de Fluorescência) apresentado pelo isolado foi 0,17, valor este bem próximo do mínimo considerado positivo ($>0,13$). Os demais isolados (110/111) resultaram em leituras variando de zero a 0,11 e, desta forma, considerados negativos para produção de enterotoxinas.

Já segundo as análises moleculares, nenhum dos 111 isolados de *Staphylococcus* avaliados pela técnica da PCR apresentava os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado para os respectivos genes nas cepas de referência usadas como controle positivo (**Figura 18**). Por este fato, pôde-se concluir que os isolados não eram potencialmente enterotoxigênicos com relação às enterotoxinas clássicas e que não houve inexpressão gênica, pois caso houvesse a detecção de genes codificadores, mesmo sem a detecção da enterotoxina, poderia-se dizer que as condições de crescimento da bactéria não eram ideais para que houvesse expressão gênica.

Comparando-se os resultados das análises fenotípicas e genotípicas quanto à produção de enterotoxinas pelos isolados analisados, obteve-se uma concordância de 99,1% entre os resultados, pois 110 dos 111 isolados testados

apresentaram resultados negativos tanto para produção de enterotoxinas clássicas, através do teste imunoenzimático ViDAS SET (bioMérieux), quanto pela análise molecular de seus genes codificadores. Porém, no isolado identificado como produtor de enterotoxinas clássicas através do *kit* imunoenzimático, não houve detecção de nenhum dos cinco genes analisados (0,9% de discordância entre as análises). Este tipo de discrepância também já foi observado em diversas pesquisas que analisaram e compararam fenotipicamente e genotipicamente a produção de enterotoxinas.

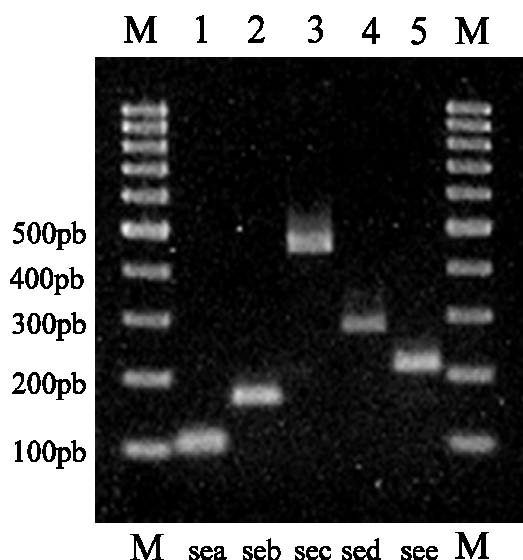


Figura 18. Produtos de amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nas cepas de referência de *S. aureus* através da técnica de PCR.

Nota: Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*), Coluna 1- ATCC 13565 (102pb), coluna 2- ATCC 14458 (164pb), coluna 3- FRI 1230 (451pb), coluna 4- ATCC 23235 (278pb), coluna 5- ATCC 27664 (209pb).

A grande maioria dos trabalhos estuda produção de enterotoxinas estafilocócicas a partir de isolados da espécie *S. aureus*, portanto, o número de estudos que relacionam SCN e produção de enterotoxinas é baixo.

McLauchlin *et al.* (2000) analisaram 129 isolados de *S. aureus* quanto à produção de enterotoxinas (SEA-SED) e compararam os resultados fenotípicos e genotípicos. Houve a detecção de 5 isolados discrepantes e destes, um isolado produtor de SEB e outro de SED (métodos RPLA e ELISA), porém os respectivos genes não foram detectados pela técnica de PCR, resultando em 4% (5/129) de discrepâncias.

A partir de *S. aureus* isolados de diversos alimentos na França, Rosec; Gigaud (2002) detectaram que 30% (76/258) abrigavam genes para enterotoxinas clássicas e 60% (147/258) abrigavam os demais genes estudados (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*). Houve discordância em 7,4% (19/258) dos isolados, pois foram positivos no teste de ELISA e não apresentaram os respectivos genes para enterotoxinas clássicas. Nota-se a grande frequência de novos genes presentes, sendo o dobro da frequência de genes para enterotoxinas clássicas, indicando a necessidade de estudos mais específicos sobre estes genes novos.

Jorgensen *et al.* (2005) observaram 4% de discrepâncias entre os métodos RPLA e PCR em seus estudos com 225 cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino e caprino e detectaram 3 isolados com o gene *sec*, sem produção de SEC, 5 isolados SEA e SEC positivos sem o gene *sea* encontrado e um isolado SEA positivo sem a presença do gene.

Normanno *et al.* (2007) observaram que 17% (109/641) de produtos derivados do leite estavam contaminados com *S. aureus* e obtiveram 209 isolados, sendo que 59,8% (125/209) eram produtores de enterotoxinas. Os resultados das análises fenotípicas e genotípicas para detecção de enterotoxinas foram comparados e apresentaram 95% de concordância, porém não foi especificada a discordância dos resultados.

Cunha; Calsolari; Araújo Júnior (2007) detectaram fenotipicamente e genotipicamente a enterotoxigenicidade de SCP e SCN e observaram que houve ausência de detecção do gene *sec* em um isolado de *S. aureus* produtor da respectiva enterotoxina e ausência do gene *sea* em outro isolado produtor de SEA.

Kerouanton *et al.* (2007) observaram concordância na detecção fenotípica e genotípica de enterotoxinas estafilocócicas em 93,9% (31/33) de *S. aureus* isolados de casos de surtos de intoxicação na França. Além disso, analisaram dois isolados com resultados discrepantes, através do PCR em tempo real e *primers* diferentes dos usados anteriormente, e detectaram genes variantes de *sed* e *sea*.

Zouharova; Rysanek (2008) avaliaram 70 isolados de *S. aureus* e detectaram que 37,1% (26/70) possuíam genes codificadores de enterotoxinas clássicas. Pelo *kit* imunológico RPLA, os pesquisadores obtiveram 12,9% (9/70) de cepas positivas para SEA-SED. A comparação entre os métodos fenotípico e genotípico resultou em 32% de discrepância de resultados. Esta diferença entre os resultados, apresentando um nível maior de detecção de genes, pode ser explicada pela inexpressão do gene em toxina ativa ou por produção muito baixa da toxina (McLAUHLIN *et al.*, 2000). Porém, neste mesmo estudo, houve a detecção de um isolado produtor de SEA, SEC e SED através do RPLA cuja confirmação genética foi apenas realizada para os genes *sea* e *sed*, não sendo detectado *sec*, sendo semelhante à questão relatada no presente estudo.

Pereira *et al.* (2009) utilizaram o VIDAS SET como método imunológico e o PCR como método genético para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em 148 culturas de *S. aureus* isoladas de diversos alimentos em Portugal. A comparação dos resultados indicou uma correlação de 80%, sendo que entre os 20% restantes houve: enterotoxina expressa, mas sem a detecção do gene (6%); o gene presente, porém não expresso em toxina (4%); o resultado do método imunológico foi positivo para SEA-SEE, mas o gene detectado foi outro, não sendo codificador de enterotoxinas clássicas (10%).

Observa-se que os trabalhos citados até aqui apenas estudaram a espécie *S. aureus*. Porém há também divergências em resultados dos escassos trabalhos em que se analisam também SCN e espécies não *S. aureus*. Vernozy-Rozand *et al.* (1996) identificaram 5 espécies de SCN produtoras de enterotoxinas, totalizando 10 isolados enterotoxigênicos. Porém, um isolado (*S. gallinarum*) foi apontado como produtor de enterotoxinas clássicas pelo método

VIDAS, mas apresentou resultados negativos no ELISA e no método genotípico utilizado (southern blot).

Como no presente estudo, Rosec; Gigaud (2002) não detectaram genes codificadores de enterotoxinas clássicas em SCN, além de terem analisado e não terem observado genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*.

Cunha; Calsolari; Araújo Júnior (2007) detectaram enterotoxinas e genes codificadores em SCN. Houve discrepância em um isolado de SCN que era positivo para a toxina TSST-1 (choque tóxico) e em outro isolado positivo para SEB e SEC, mas que eram negativos para os respectivos genes codificadores. A espécie coagulase negativa definida como maior produtora de enterotoxinas foi *S. epidermidis*.

Alguns autores propuseram hipóteses para explicar as discrepâncias entre resultados de análises fenotípicas e genotípicas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas que podem justificar a positividade fenotípica de enterotoxina, mas a ausência de genes codificadores no isolado de *S. aureus* detectado neste estudo.

Vernozy-Rozand *et al.* (1996) relataram que o resultado do *kit* VIDAS foi muito próximo ao limite de positividade do teste e, como nos outros testes não houve confirmação do resultado positivo para produção de enterotoxina, não se pôde afirmar que a cepa era enterotoxigênica. O mesmo ocorreu com o isolado cujo resultado foi positivo no teste imunoenzimático relatado neste estudo. O resultado ficou muito próximo do mínimo de positividade e como não se realizou outro teste imunológico confirmatório, apenas o genético, não se chegou a uma conclusão definitiva sobre a enterotoxigenicidade da espécie *S. aureus* isolada. Segundo Vernozy-Rozand *et al.* (1996), para provar que uma cepa é realmente enterotoxigênica, necessita-se uma correta identificação do isolado, confirmação da produção de enterotoxina através de pelo menos dois métodos imunológicos e a identificação do gene codificador, pois alguns métodos imunológicos podem resultar em reações não específicas.

McLauchlin *et al.* (2000) e Jorgensen *et al.* (2005) concluíram que poderia haver variações nas sequências dos genes analisados, dificultando a

correta ligação dos *primers* desenhados na reação do PCR, além da possível presença de uma toxina ainda não descrita que possui reação imunológica cruzada com as toxinas clássicas. Análises das sequências de DNA poderiam ser uma solução para revelar diferenças adicionais nos genes codificadores que poderiam estar presentes nos isolados.

Kerouanton *et al.* (2007) confirmaram a hipótese de McLauchlin *et al.* (2000) e Jorgensen *et al.* (2005), detectaram genes variantes de *sed* e *sea* em isolados com resultados discrepantes e concluíram que muitas vezes os *primers* utilizados podem não ter um alcance tão amplo quando há pequenas variações nos genes codificadores de enterotoxinas de *S. aureus*.

O número limitado de isolados analisados muitas vezes pode explicar a ausência de resultados positivos na detecção de genes codificadores (BECKER *et al.*, 2001). A amostragem de isolados considerada neste estudo (111) pode ter sido um fator limitante na detecção de enterotoxinas e genes codificadores, ou seja, para uma maior precisão de resultados, além de *primers* mais específicos, seria necessário um número mais elevado de cepas.

No estudo de Pereira *et al.* (2009), alguns resultados do método imunológico foram positivos para SEA-SEE, porém os genes detectados não eram codificadores de enterotoxinas clássicas, e sim genes relacionados a outras enterotoxinas (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*). Outra possível justificativa para a ausência de detecção do gene no isolado analisado no presente estudo é que foram feitas análises de apenas 5 genes codificadores de enterotoxinas clássicas e nenhum dos demais genes que codificam novas enterotoxinas (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sem*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *ses*, *set*, *seu*). Deste modo, a interação imunoenzimática do VIDAS pode ter sido mais ampla, envolvendo outras enterotoxinas além das clássicas e apresentando resultado positivo, porém não sendo confirmado na análise genética.

Neste estudo, apesar da quase totalidade dos isolados não terem produzido enterotoxinas clássicas, havia um número bem elevado de *Staphylococcus* em diversos produtos analisados, não excluindo um possível risco de produção das demais enterotoxinas já descritas e demonstrando a falta de

cuidados higiênico-sanitários e de boas práticas durante a produção e comercialização destes alimentos.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001), além de estabelecer a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, deveria exigir também a contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa. Porém, mais importante e correto seria a determinação da detecção de enterotoxinas produzidas pelo gênero *Staphylococcus* (SCN e SCP) nos alimentos, pois, desta forma, seria possível realmente controlar a qualidade dos produtos comercializados, evitar a grande quantidade de surtos causados por estes micro-organismos, além de diminuir impactos na economia por faltas no trabalho e gastos com serviços de saúde pública. Para isto ainda são necessários diversos estudos, desenvolvimento de *kits* rápidos para detecção não apenas de enterotoxinas clássicas, mas também das novas enterotoxinas, cujos genes codificadores são cada vez mais encontrados em alimentos, podendo ser grandes responsáveis por muitos surtos de intoxicação. Além disso, são necessários estudos mais aprimorados sobre genes variantes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, bem como o desenvolvimento de *primers* mais específicos que auxiliem nesta detecção.

5. CONCLUSÕES

- a) A correlação entre colônias típicas crescidas em meio BP e cepas coagulase positivas e enterotoxigênicas não deve ser seguida como regra; colônias atípicas, portanto, devem ser estudadas e não desprezadas;
- b) O sistema *API-Staph* (bioMérieux) não foi eficiente para a identificação de espécies de *Staphylococcus* isoladas dos derivados lácteos analisados neste estudo, sendo necessárias a realização de testes adicionais;
- c) Em trabalhos de detecção de enterotoxinas, é importante a realização de dois testes imunológicos ou imunoenzimáticos diferentes para a confirmação precisa de cepas produtoras de enterotoxinas;
- d) Os produtos derivados do leite analisados neste trabalho apresentam fatores de risco associados a seu consumo, devido à elevada população de *Staphylococcus* detectada, confirmando-os como veículos de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas; *Staphylococcus* coagulase positiva foi detectado somente em queijos Minas frescal e meia cura;
- e) Nos alimentos derivados do leite estudados, não foi comum a detecção de espécies de *Staphylococcus* potencialmente produtoras de enterotoxinas clássicas;
- f) Houve concordância de 99,1% entre os testes fenotípicos e genotípicos utilizados para detecção de enterotoxinas;
- g) As altas contagens e presença de SCP e SCN nas amostras podem representar um risco em potencial de produção de enterotoxinas não clássicas, já que os genes e as enterotoxinas clássicas não foram detectados na maioria dos isolados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M MICROBIOLOGY PRODUCTS. Placa Petrifilm para contagem rápida de *S. aureus*. Folheto de instrução de uso. USA, 1999.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. 2.ed. Royal Society of Chemistry, 2000.

AKINEIDEN, O.; HASSAN, A.A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.211-216, 2008.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, p.578-580, 2000.

AL-TARAZI, Y.H.; ALBETAR, M.A.; ALABOUDI, A.R. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International**, v.42, p.374–379, 2009.

ANDRÉ, M.C.D.P.B., CAMPOS, M.R.H., BORGES, L.J., KIPNIS, A., PIMENTA, F.C., SERAFINI, A.B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, v.19, p.200–207, 2008.

AOAC, 2005. Disponível em [HTTP://aoac.org/vmeth/newsmttd.htm](http://aoac.org/vmeth/newsmttd.htm). Acesso em: julho/2010.

ARAGON-ALEGRO, L.C., KONTA, E.M., SUZUKI, K., SILVA, M.G., ARAÚJO JÚNIOR, A.F., RALL, R., RALL, V.L.M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v.18, p.630-634, 2007.

ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, n.92, p.1172-1177, 2002.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v.130, p.33-40, 2003.

AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**, Columbus, v. 6, n. 6, p. 1474-1480, June, 1967.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL ONLINE (BAM). Página desenvolvida e mantida pelo **Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN)**, centro ligado ao Food and Drug Administration (FDA), 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/>. Acesso em: 15 de abril de 2009.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Microbiology**, Symposium Supplement, 1S-8S., 1990.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive coci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington, D. C.: ASM, v.1, p.384-404, 2003.

BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M.; NUNEZ, M. A Quantitative Study of Enterotoxin Production by Sheep Milk Staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.566- 569, 1988.

BAYLES, K.W., IANDOLO, J.J. Genetic and Molecular Analyses of the Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.9, p.4799-4806, 1989.

BECKER, K., HAVERKÄMPER, G., VON EIFF, C., ROTH, R., PETERS, G. Survey of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene in Non-*Staphylococcus aureus* Species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, p.407-409, 2001.

BECKER, K., ROTH, R., PETERS, G. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2548-2553, 1998.

BENNETT, R.W. Atypical Toxigenic *Staphylococcus* and Non-*Staphylococcus aureus* Species on the Horizon? An Update. **Journal of Food Protection**, v.50, n.10, p.1123-1126, 1996.

BERGDOLL, M.S.; SURGALA, J.; DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 334-338, Mar., 1959.

BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 90, n. 5, p. 1481-1485, Nov., 1965.

BERGDOLL, M.S. The staphylococcal enterotoxins. In: Mateles, R.I., Wogan, G.N. (Eds.), *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*. MIT Press, Cambridge, pp. 1-25, 1967.

BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.; WEISS, K.F. Identification of enterotoxin E. **Infection and Immunity**, Washington, v.4, n.5, p. 93-593, 1971.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates **Lancet**, v.9,n.1(8228), p.1017-1021, 1981.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., cap.11, p.464-513, 1989.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p.91-100, 1990.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, v.229, p.185-187, 1988.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxin, toxic shock syndrome and staphylococcal pyrogenic enterotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemical and Immunology**, v. 55, p. 1-35, n.1, 1992.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.719-730, 2004.

BOEREMA, J.A.; CLEMANS, R.; BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.192-201, 2006.

BOHACH, G. A.; SCHIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 15-20, 1987.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A.; SANTOS, D.A.; CARMO, L. S.; DIAS, R.S.; SILVA, M.C.C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.545-550, 2006.

BORGES, M.F. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. (Tese) Doutorado em Tecnologia de Alimentos –

Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 199p, 2006.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BORJA, C.R., BERGDOLL, M.S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. **Biochemistry**, v.6, n.5, p.1467-1473, 1967.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 18p., 2001.

BRECKINRIDGE, J.C.; BERGDOLL, M.S. Outbreak of Food-Borne Gastroenteritis Due to a Coagulase-Negative Enterotoxin-Producing *Staphylococcus*. **New England Journal of Medicine**, v.284, n.10. p.541-543, 1971.

BRETT, M. M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, London, v.84, n.S1, p.110S-118S, Jul. 1998.

CANADA. Health Products and Food Branch. Ottawa. **Enumeration of *Staphylococcus aureus* in cheese**. Government of Canada. 2002. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mfo22-eng.pdf. Acesso em: agosto/2010.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.581-586, 2003.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, p.262–267, 2007.

CASHMAN, K. D. Milk minerals (including trace elements) and bone health. **International Dairy Journal**, v.16, p.1389-1398, 2006.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.94, n.6, p.1875-1882, 1967.

CHALLA, A.; APAZIDOU, H.; TZOUFI, M.; KRITIKOU, E.; SIOMOU, E.; LAPATSANIS, P.; SIAMOPOULOU, A. Nutritional rickets revisited in children of Albanian origin (two cases). **Nutrition Research**, v.23, p.1495-1502, 2003.

CHEN, T.R., CHIOU, C.C., TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.189-197, 2004.

CHOU, C. C.; CHEN, L. F. Enterotoxin Production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a Coagulase-Negative strain. **Journal of Food Protection**, v.60, n.8, p.923-927, 1997.

COLOMBARI, V.; MAYER, M.D.B.; LAICINI, Z.M.; MAMIZUKA, E.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Foodborne Outbreak Caused by *Staphylococcus aureus*: Phenotypic and Genotypic Characterization of Strains of Food and Human Sources. **Journal of Food Protection**, v.70, n.2, p.489–493, 2007.

COMMITTEE ON NUTRITION, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Calcium Requirements of infants, Children and Adolescents. **Pediatrics**, v.104, n.5, 1152-1157, 1999. Disponível em: <http://aappolicy.aappublications.org/cgi/reprint/pediatrics;104/5/1152.pdf>. Acesso em: agosto/2010.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n. 7, p. 2954-2960, July, 1988.

CRASS, B.A.; BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.43-45, 1986.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.299–305, 2005.

CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; CASTIGLIONI, B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.586-591, 2007.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.70-74, 2006.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.A. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology** v.51, n.4, p.381-390, 2007.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.A. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.70-74, 2006.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.263-271, 2002.

DABROWSKI, W.M.; SIKORSKI, Z. E. Toxins in Food (Chemical and functional properties of food series). CRC Press, 355p, 2005.

DE BUYSER, M.L; DUFOUR, B.; MARIE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DELBES, C.; ALOMAR, J.;CHOREGUI, N.; MARTIN, J.F.; MONTEL, M.C. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked semihard cheese from cows raw milk. **Journal of Food Protection**, v.69, p.2161-2167, 2006.

DIFCO MANUAL. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories. Detroit, Michigan, USA, 1994.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.16-34, 2000.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition, Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.

ELSAYED, S.; LAUPLAND, K.B. Emerging gram-positive bacterial infections. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.24, p.587-603, 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, 2008. Disponível em:
<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0704.php>
Acesso em: out/2009.

ESPER, L. M. R. Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP. Campinas, 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2006.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Disponível em: <http://www.bacterio.net>. Acesso em: set/2010.

EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S. *et al.* Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.311-316, 1988.

FAGUNDES, H.; BACHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.376-380, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. The “Bad Bug Book”**, 1998. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070015.htm>. Acesso em junho/2008.

FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETTI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Gram-Positive Pathogens**. Washington, DC. ASM Press, 735p., 2000.

FITZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; BOHACH, G.A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C.J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.63-70, 2001.

FRANK, J. F. Milk and Dairy Products. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, v.23, p.260–267, 2006.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a ed., New York, Berlin: Springer-Verlag, v.1, p.119–166, 2001.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2001.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICHARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.51, p.245-248, 2003.

HAYES, M.C.; BOOR, K. **Raw milk and fluid milk products**. In: MARTH, E. H.; STEELE, J.L. (Eds.). Applied dairy microbiology, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 736p., 2001.

HÉBERT, G.A.; CROWDER, C.G.; HANCOCK, G.A.; JARVIS, W.R.; THORNSBERRY, C. Chacacteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.10, p.1939-1949, 1988.

HOOVER, D.G., TATINI, S.R. AND MALTAIS, J.B. Characterization of staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.649-660, 1983.

HOPPE-SEYLER, T.S.; JAEGER, B.; BOCKELMANN, W.; NOORDMAN, W.H.; GEIS, A.; HELLER, K.J. Molecular identification and Differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.211-218, 2004.

HUONG, B.T.M.; MAHMUDA, Z.H.; NEOGI, S.B.; KASSU, A.; NHIE, N.V.; MOHAMMADA, A.; YAMATO, M.; OTA, F.; LAM, N.T.; DAO, H.T.A.; KHAN, N.C. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. **Food Control**, v.21, p.166–171, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal**. Volume 36, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2008/ppm2008.pdf>. Acesso em: agosto/2010.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA (IICA). **Caderno de Estatísticas do Agronegócio Brasileiro** – Quarto trimestre de 2009. Disponível em:

http://www.iica.org.br/Docs/Publicacoes/Agronegocio/CadernoEstatisticas_12-2009.pdf. Acesso em: agosto/2010.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in foods: Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, v.5, 513p., 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in foods: Microbial ecology of food commodities**. Maryland: Aspen Publishers, v.6, 763p., 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in foods: Microbiological testing in food safety management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, v.7, 2002.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAHAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p.2793-2795, 2005.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.302–310, 2008.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. **Staphylococcus aureus**. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). Food microbiology, fundamentals and frontiers. 2. ed., Washington D. C.: ASM, Cap.19, p.411-434, 2001.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *cgc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan., 2001.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. New York: Springer, 790 p, 2005.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 166, n. 1, p. 20-33, Apr., 1986.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; ROVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 158-167, 2005.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.369–375, 2007.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., *et al.* (ed.) **Manual of clinical microbiology**. 6ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p.282-298, 1995.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, p.82-88, 1975.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. **Genus IV. *Staphylococcus***. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, p.1013–1035, 1986.

KOMATSU, R.S.; RODRIGUES, M.A.M.; LORENO, W.B.N.; SANTOS, K.A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia – MG. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.316-321, 2010.

KURODA, M.; OHTA, I.; UCHIYAMA, T.; BABA, H.; YUZAWA, I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y.; NAGAI, J.Q.; LIAN, T.; ITO, U.; KANAMORI, H.; MATSUMARU, A.; MARUYAMA, H.; MURAKAMI, A.; HOSOYAMA, Y.; MIZUTANI, N.K.; TAKAHASHI, T.; SAWANO, R.; INOUE, C.; KAITO, K.; SEKIMIZU, H.; HIRAKAWA, S.; KUHARA, S.; GOTO, J.; YABUZAKI, M.; KANEHISA, A.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, K.; FURUYA, C.; YOSHINO, T.; SHIBA, M.; HATTORI, N.; OGASAWARA, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.357, p.1225-1240, 2001.

KWON, N.H.; KIMA, S.H.; PARKA, K.T.; BAEA, W.K.; KIMA, J.Y.; LIMA, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIMA, J.M.; JUNG, W.K.; NOHA, K.M.; BAHACHD, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.137-145, 2004.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.5, p.702-709, 2005.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins**. In: DOWNES, F. P., ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4a ed. Washington, D. C., cap. 39, p. 387 – 403, 2001.

LAWRENCE, J. R.; KORBER, E.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDNELL, E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.20, p. 6558-6567, 1991.

LEITE BRASIL. Associação Brasileira dos Produtores de Leite. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/estatisticas.htm>. Acesso em: nov. 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003.

LI, F.C.; CHENG, C.C. Growth and enterotoxins production by coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. **Food Science**, v.24, n.1, p.120-128, 1997.

MACDONALD, H. B. Dairy nutrition: What we knew then to what we know now. **International Dairy Journal**, v.18, p.774–777, 2008.

MARIANO, F.A.; FOLLY, M.M.; TEIXEIRA, G.N.; CARMO, L.S.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n.2, p.105-110, 2007.

MARÍN, M. E.; ROSA, M. C.; CORNEJO, I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* Strains Isolated from Spanish Dry-Cured Hams. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.3 p.1067-1069, 1992.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society of Microbiology**, v.58, p.202-207, 1992.

MARTÍN, M.C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. **Food Microbiology**, v.20 , p.605–610, 2003.

MCLAUCHLIN, J., NARAYANAN, G.L., MITHANI, V., O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.63, p.479–488, 2000.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.

MICHELIN, A.F.; CARMO, L.S.; CARLOS, I.Z. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigui, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.46-49, 2006.

MICROBE LIBRARY. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://www.microbelibrary.org/>. Acesso em: jan.2011.

MILLER, G. D., JARVIS, J. K.; MCBEAN, L. D. **Handbook of dairy foods and nutrition** (2ª ed.). National Dairy Council. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 423p, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira.** Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF, 2005. Disponível em: www.saude.gov.br/nutricao. Acesso em: julho/2010.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.4311-4314, 1999.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.66-72, 2007.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T. ; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization staphylococcal enterotoxins of type G and from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3337-3348, July, 1998.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007.

NANU, E.; NARAYAN, K.G. Enterotoxin production by Staphylococci isolated from pork Kabab, Salami and other sources by ELISA. **Journal of Food Science and Technology**, v.29, n.4, p.383-384, 1992.

NASCIMENTO, M.G.F.; CORBIA, A.C.G.;NASCIMENTO, E.R. Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*. Rio de Janeiro, Comunicado Técnico 45. Embrapa, 2001.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;** Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6), USA, 2003.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BATOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.73-39, 2005.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.290–296, 2007.

NOUT M.J.R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, v.27, p.291-298, 1994.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento em alimentos de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

OLIVEIRA, A.M.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk and confectionary cream. **Journal of Food Science**, v.75, n.7, p.475-481, 2010.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D-L.; UEDA, S. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p.857–862, 2002.

OMOE, K., HU, D.-L., TAKAHASHI-OMOE, H., NAKANE, A. AND SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v.71, n.10, p.6088–6094, 2003.

OMORI, G.; KATO, Y. A Staphylococcal Food-Poisoning Caused by a Coagulase-Negative Strain. **Biken's Journal**, v.2, p.92, 1959.

ONO, H.K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; IWAKABE, Y.; HU, D-L.; KATO, H.; SAITO, N.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, p.4999–5005, 2008.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 2916--2919, Feb., 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. I.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 3, p. 360-366, Mar., 2001.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M.L.; GUILLIER, F.; GROULT, J.; FELIX, B.; SALAH, S.; DELMAS, G.; HENNEKINNE, J.A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveillance**, 2010;15(13):pii=19528. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19528>. Acesso em: out/2010.

PELISSER, M.R.; KLEIN, C.S.; ASCOLI, K.R.; ZOTTI, T.R.; ARISI, A.C.M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.145-148, 2009.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v.26, p.278–282, 2009.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. **Journal of Food Protection**, v.45, p.1306-1309, 1982.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-production staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, n.1, p.19-26, 1991.

PEREIRA, K. S. Identificação e verificação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa isolados a partir de salames brasileiros industrializados e avaliação da qualidade microbiológica do produto. Campinas, 99p. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

PIMBLEY, D. W.; PATEL, P. D. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins, **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.84, n.S1, p.98S-109S, 1998.

POLI, A.; GUGLIELMINI, E.; SEMBENI, S.; SPIAZZI, M.; DELLAGLIO, F.; ROSSI, F.; TORRIANI, S. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.529–534, 2007.

RAHIMI, E.; SAFAI, H.G. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.393–394, 2010.

RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES JR., A.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G.; ARAÚJO JR., J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.408–413, 2008.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES JR., A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR., J.P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. Isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.59-65, 2010.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; VERAS, J.F.; SOUZA, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.825-829, 2005.

REISER, R. F.; ROBBINS, R.N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G.P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. **Infection and Immunity**, Washington, v. 45, n. 3, p. 625-630, Sept., 1984.

RODRIGUES, K.L.; MOREIRA, A.N.; ALMEIDA, A.T.S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M.J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A.G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.297-299, 2004.

RODRIGUEZ, L.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J.; BERMUDEZ, E.; ASNSIO, M. A. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.61-70, 2002.

SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v.22, n.5, p.458-61, 1988.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SÃO PAULO, ESTADO. Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância Sanitária. COMUNICADO CONJUNTO CVS/IAL Nº 1/03 de 15-01-03. **Programa de Análise Fiscal de Alimentos – Programa Paulista 2002 - RELATÓRIO FINAL**. Publicado no D.O.E de 01/02/2003, seção 1. Suplemento, 2003.

SCHMID, D.; FRETZ, R.; WINTER, P.; MANN, M.; HÖGER, G.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; LADSTÄTTER, J.; MAYER, N.; MARTIN, A.; ALLERBERGER, F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wien Klin Wochenschr**, v.121, p.125–131, 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. Acesso em: out/2009.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1347-1353, 2000.

SHIMAMURA, Y.; KIDOKORO, S.; MURATA, M. Survey and properties of *Staphylococcus aureus* isolated from Japanese-style desserts. **Bioscience, Biotechnoogy and Biochemistry**, v.70, n.7, p.1571-1577, 2006.

SHUIEP, E.S.; KANBAR, T.; EISSA, N.; ALBER, J.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; EL ZUBEIR, I.E.M.; WEISS, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw camel milk samples. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.211-215, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed- São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103–107, 2005.

SISTEMA REGIONAL DE INFORMACIÓN PARA LA VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (SIRVETA). Página desenvolvida e mantida pelo Instituto Pan americano de Proteção dos Alimentos e Zoonoses (INPPAZ), 2002. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm>. Acesso em: julho/2010

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

STRUELENS, M.J. Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n.5, p.581-585, 1998.

THE DAIRY COUNCIL. **The Nutritional Composition of Dairy products**, 2010. Disponível em: <http://www.milk.co.uk/page.aspx?intPageID=306>. Acesso em: junho/2010.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, p.819-823, 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), 2009. Disponível em: http://www.mypyramid.gov/pyramid/milk_amount.aspx#. Acesso em: agosto/2010.

VALLE. J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHC. J.; ORDEN, J.A.; VADILLO. S. Enterotoxin Production by Staphylococci Isolated from Healthy Goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1323-1326, 1990.

VARGUN, F.; VATANSEVER, L. Isolation of staphylococci from milk and cream sold at the Kars market and detection of their enterotoxigenicity. **Medycyna Weterynaryjna**, v.63, n.5, p.538-540, 2007.

VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CANTINI, A.; NICOLI, J.R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.410-415, 2008.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUYA, C.; PREVOSTB, G.; LAPEYREC, C.; BESD, M.; BRUND, Y.; FLEURETTED, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.271-280, 1996.

VIÇOSA, G.N.; MORAES, P.M.; YAMAZI, A.K.; NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. **Food Microbiology**, v.27, p.447-452, 2010.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v.33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VON RHEINBABEN, K. E.; HADLOK, R. M. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.47, n.1, p. 41-45, 1981.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J.K.; PAUSTIAN, M.L.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P.M. Repression of the *Staphylococcus aureus* gene regulator in serum and in vivo. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.1095-1101, 2002.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.246-251, 2008.

ZHANG, S.J.; IANDOLO, J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (seJ). **FEMS Microbiological Letters**, v.168, p.227-233, 1998.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, v.48, p.107-114, 1994.

ZOUHAROVA, M.; RYSANEK, D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxigenic Strains From Bulk Tank Milk. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p.313-319, 2008.