

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÊNICOS: PESQUISA DE
CEPAS PRODUTORAS E BAIXO PRODUTORAS DE
ENTEROTOXINAS ISOLADAS DE LEITE CRU DE BOVINO**

Parecer

ANA MARIA DE OLIVEIRA
BIÓLOGA

*Este exemplar corresponde
a redação final da tese
defendida por*

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
ORIENTADOR

*Ana Maria de Oliveira
e aprovada pela
Comissão Julgadora
em 08.05.95*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos para a obtenção
do título de Mestre em Ciência de
Alimentos.

Pereira

CAMPINAS/1995



UNICAMP
OL4e
30/24625
433/95
R\$ 11,00
23/05/95
Im.00069552-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

OL48e

Oliveira, Ana Maria de

Estafilococos enterotoxigênicos: pesquisa de cepas produtoras e
baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino / Ana
Maria de Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

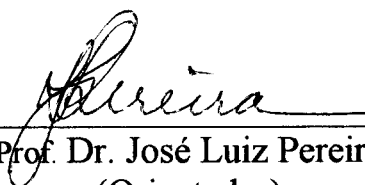
Orientador: José Luiz Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

José
Engenharia

1. Enterotoxinas. 2. Mastite. 3. *Enterotoxinas - Detecção. 4.
*Intoxicação alimentar. 5. *Intoxicação Estafilocócica. I. Pereira,
Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
de Alimentos. III. Título.

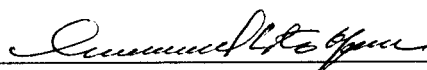
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Orientador)



Prof. Dr. Mauro F. de Freitas Leitão
(Membro)



Prof. Dr. Carlos Alberto M. Lopes
(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Membro)

Campinas, 08 de maio de 1995.

*O crédito pertence àquele
que lutou com denodo;
que não desistiu nunca;
que sente grande entusiasmo e grande empenho;
que se devota a uma boa causa;
e que, no melhor dos casos, obtém ao fim
o triunfo da grande realização;
e que, no pior, quando fracassa,
ao menos fracassa ousando galhardamente.
Assim, o seu lugar nunca será
entre aquelas almas tímidas
que não conhecem nem a vitória nem a derrota.*

Theodore Roosevelt

Aos meus pais, Luiz e Inês, exemplos de amor e carinho;

O meu carinho e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, professor de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pela devotada orientação e incessante dedicação, pela amizade que sempre demonstrou durante a realização deste trabalho e pela confiança depositada.

- À Norma Teruko Miya, pela paciência e amizade;
- À Luciane Mie Kawashima e sua família, pelo carinho;
- Ao Marcolino pela amizade, gentileza e auxílio na realização das fotos e slides;
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Padovani, do Departamento de Bioestatística do IB - UNESP - Botucatu, pela realização da análise estatística;
- Aos funcionários do Centro de Informática da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, pelo auxílio prestado na digitação e impressão deste trabalho;
- Ao pessoal da Secretária do Departamento de Ciência de Alimentos e da Secretária de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP;
- A entidade CNPQ, pela bolsa concedida;
- A todos do laboratório de microbiologia de Alimentos;
- Aos verdadeiros amigos, pela amizade sincera e convivência;
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, Muito Obrigada.

ÍNDICE

página

RESUMO	01
SUMMARY	03
I - INTRODUÇÃO	04
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
II-1 CLASSIFICAÇÃO	08
II-2 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	09
II-3 ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÊNICOS	11
II-4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	13
II-4.a - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	16
II-4.b - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS	17
II-4.c - AÇÃO BIOLÓGICA DAS ENTEROTOXINAS	20
II-4.d - DETECÇÃO DAS ENTEROTOXINAS	22
II-4.d.1 - Métodos Biológicos	22
II-4.d.2 - Métodos Sorológicos	22
II-5 - INCIDÊNCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ENTEROTOXIGÊNICOS.....	25
III - MATERIAIS E MÉTODOS	30

III-1. MATERIAIS.....	30
III-1.a - Amostragem	30
III-1.b - Meios de Cultura	30
III-1.c - Reagentes para Testes Bioquímicos	31
III-1.d - Reagentes para Análise de Enterotoxinas	31
III-1.e - Equipamentos Utilizados	31
III-2. MÉTODOS	32
III-2.a - Pesquisa de Estafilococos Enterotoxigênicos	32
III-2.b - Contagem, Isolamento e Identificação	33
III-3 - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	36
III-4 - DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS	37
III-5 - DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS NOS SOBRENADANTES CONCENTRADOS	40
III-6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
IV - RESULTADOS	42
V - DISCUSSÃO	61
VI - CONCLUSÕES	68
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
VIII - APÊNDICE	87

RESUMO

Nesta pesquisa investigou-se a capacidade enterotoxigênica de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas estafilocócicas isoladas em amostras de leite cru de bovino, fornecidas por uma cooperativa de produtores de leite da região de Campinas-SP.

Através da análise de 140 amostras de leite foram isoladas 574 colônias com características presuntivas de estafilococos enterotoxigênicos de acordo com o método proposto por Tatini et al. (1984). Tanto as cepas positivas quanto as negativas aos testes de presença das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termorresistente (TNase) foram testadas para avaliar a capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas.

A técnica utilizada para a produção de enterotoxinas estafilocócicas foi a de cultura em papel celofane sobre o meio 3% de triptona, 1% extrato de levedura e 1,5% de ágar, e a detecção foi realizada através do método de imunodifusão dupla em lâmina.

Do total de cepas isoladas, 54,7% foram enterotoxigênicas. A enterotoxina estafilocócica D (EED) foi produzida por 95,2% das culturas; 0,3% produziram EEA; 1,0% produziu EEB. Algumas cepas produziram 2 tipos de enterotoxinas, 0,3% produziram EEA - EEB; 1,6% EEA - EED e 1,6% EEB - EED.

Para a detecção de cepas baixo produtoras de enterotoxinas, os sobrenadantes das culturas negativas foram liofilizados e ressuspendidos a um volume 10 vezes menor que o inicial. Assim, detectou-se, entre estas culturas, mais 19,0% de linhagens de estafilococos enterotoxigênicos. Sendo produzidas as EED, EEA, EEB e EEC nos valores de 68,8%, 12,8%, 7,3% e 2,8%, respectivamente. Antes da concentração dos sobrenadantes não havia sido detectada EEC. As EEA - EEB foram produzidas por 3,7% das cepas e, EEB - EED por 4,6%.

Os dados obtidos evidenciam a contaminação do leite por cepas coagulase e desoxirribonuclease termorresistente positivas e negativas e produtoras de algum tipo de enterotoxina, o que expõe a população consumidora ao risco de intoxicação alimentar, uma vez que, a pesquisa de enterotoxigenicidade de estafilococos coagulase negativa não é uma técnica de rotina realizada nos laboratórios de análise microbiológica de alimentos.

SUMMARY

This work investigated the enterotoxigenic of producing and low producing staphylococcal enterotoxins strains in cow's raw milk samples supplied by the Campinas Cooperativa, Campinas-SP.

The 140 milk samples were presumptively tested for the presence of enterotoxigenic staphylococci, according to the method of Tatini et al. (1984). Coagulase and termonuclease positive and negative strains were tested for the capacity of producing staphylococcal enterotoxins.

Production of staphylococcal enterotoxins was evaluated by the cellophane-over-agar method described by Robins et al. (1974). All strains were examined for enterotoxins A, B, C and D. For the detection it was used the immunodifusion method, applying the optimal sensitivity plate.

The percentage of enterotoxigenic staphylococci isolates was 54,7%. The staphylococcal enterotoxins (SE) types most frequently detected was SED (95,2%), followed by SEB (1,0%) and by SEA (0,3%). Some strains produced 2 types of enterotoxins, SEA/SEB (0,3%); SEA/SED (1,6%) and SEB/SED (1,6%).

The low enterotoxin producing staphylococcal strains were detected after ten fold concentration of initial volume of supernatant of negatives cultures. Thus, it was detected 19,0% of staphylococcal enterotoxigenic strains. SEC was only detected in concentrated supernatant. The SEA/SEB and SEB/SED were produced for 3,7% and 4,6% of the tests strains, respectively.

The results showed the contamination of milk for coagulase and termonuclease positives and negatives strains which produced some type of staphylococcal enterotoxins. The risk of food poisoning is relatively high because the study of enterotoxigenic negative coagulase staphylococci is not a routine procedure utilized in the food microbiology laboratories.

I- INTRODUÇÃO

Por sua grande importância em saúde pública e a frequência com que ocorrem, as doenças causadas por estafilococos vêm atraindo o interesse de muitos pesquisadores há vários anos.

O gênero *Staphylococcus* está subdividido atualmente em 23 espécies e entre elas, destaca-se *Staphylococcus aureus* que frequentemente está envolvido em surtos de intoxicação alimentar.

Devido à capacidade dos estafilococos desenvolverem-se em uma série de substratos, os alimentos constituem alvo de contaminação, causando anualmente intoxicação em milhões de indivíduos, acarretando não apenas problemas a saúde humana como também perdas econômicas, quando estes surtos ocorrem em escolas, empresas, hospitais, restaurantes, etc. onde são servidas refeições coletivas.

Os estafilococos podem produzir sob certas condições em meio de cultura e em alguns alimentos um grupo de exoproteínas, as enterotoxinas, capazes de provocar uma síndrome gastroentérica quando ingeridas pelo homem. Estas enterotoxinas são termoestáveis, resistentes às temperaturas normalmente utilizadas no processamento dos alimentos e às enzimas proteolíticas do trato digestivo.

Frequentemente, os alimentos de origem animal, especialmente o leite e os produtos derivados, estão associados a surtos de intoxicação por estes microrganismos. Alguns estudos demonstraram que o úbere de vacas adultas é a fonte mais importante de contaminação estafilocócica, em virtude das frequentes ocorrências de mastites, tornando-se portanto, um reservatório frequente de microrganismos, facilitando, assim, sua transmissão ao leite durante a ordenha.

Staphylococcus aureus tem sido o agente etiológico mais frequentemente isolado das mastites bovina no Brasil. O principal ciclo de infecção desta doença é representado pela vaca infectada, que ao eliminar o agente etiológico através do leite, propicia condições favoráveis para a contaminação das mãos do ordenhador, das fossas nasais, dos bocais da ordenhadeira e do meio ambiente, que podem determinar uma rápida disseminação dos microrganismos causadores de mastites a outros animais do rebanho e a outros ordenhadores (CORRÊA & CORRÊA, 1979), representando um perigo potencial para a população consumidora.

No Brasil, é muito comum a comercialização de queijos produzidos com leite não pasteurizado. Mesmo havendo o tratamento térmico do leite, dependendo do tempo decorrido entre a ordenha e o processamento, o microrganismo pode crescer e atingir populações suficientes para a produção de enterotoxinas em quantidades significativas, não sendo a mesma inativada pela pasteurização, devido à sua elevada resistência térmica.

Para os produtores de leite, os estafilococos também são um problema sério, causando perda econômica em termos de diminuição na produção de leite e ocasionando um aumento nos custos com serviços veterinários e seleção dos animais mastíticos.

As enterotoxinas podem ser detectadas diretamente no alimento, porém, a limitação consiste no custo ainda elevado e escassez de reagentes para esta análise e a pouca divulgação e sistematização de análises sorológicas em alimentos.

Dentre as técnicas disponíveis, a imunodifusão dupla em gel tem sido a mais utilizada na triagem e reconhecimento de linhagens produtoras de enterotoxinas, dada a facilidade de realização do ensaio e a possibilidade de utilização de reagentes sem um elevado grau de pureza. No entanto, a sensibilidade deste método está em torno de 500 ng de toxina por mL do sobrenadante, o que impede a detecção de quantidades inferiores.

Muitas linhagens de *Staphylococcus aureus* apresentam-se como produtoras de baixos níveis de toxinas, sendo, portanto, consideradas não enterotoxigênicas quando testadas pelos métodos convencionais.

Na tentativa de redução de resultados falsamente negativos e devido à facilidade de realização do método de imunodifusão radial, alguns procedimentos visando concentrar os sobrenadantes das culturas têm sido propostos, como é o caso da liofilização ou redução do volume por diálise contra polímeros higroscópicos.

A determinação de quantidades mínimas de enterotoxinas pode também ser realizada por métodos mais sensíveis e sofisticados, como é o caso dos ensaios imunoenzimáticos, radioimunoensaio e aglutinação em látex. No entanto, estas técnicas nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios, dada a necessidade de infra-estrutura, no que diz respeito a equipamentos e reagentes com alto grau de pureza, além de pessoal técnico qualificado.

No Brasil, há poucas informações a respeito da presença de linhagens enterotoxigênicas encontradas no leite, e os trabalhos existentes (NADER et al., 1988; FREITAS e MAGALHÃES, 1990; LOPES et al., 1990) não relatam sobre cepas produtoras de quantidades diminutas destas enterotoxinas.

Assim, novas investigações tornam-se necessárias para avaliar o risco que as condições microbiológicas do leite possa representar à saúde da população que consome este produto e seus derivados. É interessante também estender estas investigações a outros alimentos passíveis de contaminação.

OBJETIVOS:

Os objetivos principais deste trabalho foram:

- 1 - Avaliar o nível de contaminação de leite cru por estafilococos enterotoxigênicos.
- 2 - Detectar e verificar a presença de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas estafilocócicas, avaliando assim, o risco potencial de intoxicação alimentar estafilocócica para a população consumidora.
- 3 - Correlacionar a produção de enterotoxinas com as enzimas coagulase e termonuclease, visando oferecer novos dados à futuras investigações na detecção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II-1 - CLASSIFICAÇÃO

A família Micrococcaceae , de acordo com 9ª edição do Manual de Bergey (SCHLEIFER, 1986), é composta por quatro gêneros: *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* e *Staphylococcus*. O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 19 espécies e sub-espécies. Recentemente, FRENEY et al. (1988), quando descreveram duas novas espécies de *Staphylococcus* de amostras clínicas, citaram que já foram identificadas 23 espécies do gênero *Staphylococcus*. Este diferencia-se dos outros gêneros da família em alguns aspectos como quantidade de guanina + citosina (G + C) do DNA, composição da parede celular e habilidade de crescer e fermentar glicose anaerobicamente (BERGDOLL, 1979).

A coagulação de plasma de coelho é uma característica de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* sub. *hyicus* (a coagulação do plasma é retardada para essa espécie). Produção de desoxirribonuclease termorresistente é uma característica de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* sub. *hyicus*, enquanto a espécie *Staphylococcus carnosus* apresenta uma reação retardada e as espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus hyicus* sub. *chromogenes* são negativos ou fracamente positivos (SCHLEIFER, 1986)

II-2 - PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Os estafilococos são microrganismos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase fortemente positiva, não móveis, não fotossintéticos e não formadores de esporos (MINOR & MARTH, 1972). Os estafilococos são mesófilos que crescem melhor em condições aeróbias. A temperatura ótima de crescimento é de 37° C, podendo algumas linhagens crescer em valores de 39 a 40°C (PEREIRA & SALZBERG, 1982), e a temperatura mínima onde foi possível verificar o crescimento foi de 10°C. Muitas linhagens produzem pigmentos amarelos ou alaranjados, particularmente em meios contendo cloreto de sódio, e fermentam uma variedade de carboidratos produzindo ácido e não gás (MINOR & MARTH, 1972).

A maioria das linhagens pode crescer na presença de antibióticos, como a penicilina e polimixina (THATCHER, 1968). GARCIA et al. (1988) encontraram uma alta incidência de estafilococos isolados de queijos que foram resistentes à novobiocina. LOPES et al. (1990) ao isolarem *Staphylococcus aureus* de leite proveniente de vacas mastíticas, verificaram a presença de cepas resistentes à penicilina e estreptomicina, e sensíveis à ampicilina, amicacina, oxacilina, tetraciclina, cefalotina e gentamicina.

TATINI (1973) relatou que o pH ótimo para *Staphylococcus aureus* crescer está no intervalo entre 6,0 a 7,0, podendo crescer numa faixa entre 4,0 a 9,8; demonstrou, também, que *Staphylococcus aureus* cresce até em concentração de 20% de cloreto de sódio.

Staphylococcus aureus também tem sido pesquisado por sua habilidade em tolerar diminuição da atividade de água (aw). Isto é muito interessante ao microrganismo, pois pode competir com outros patógenos mais sensíveis associados ao alimento. A aw ótima para *Staphylococcus aureus* crescer é maior que 0,99, com uma variação de 0,83 a > 0,99 (TATINI, 1973).

A detecção de coagulase é um teste amplamente aceito para confirmar e identificar linhagens de *Staphylococcus aureus*. Tem sido demonstrado no entanto, que a produção da enzima coagulase não é propriedade única de *Staphylococcus aureus*, sendo também produzida por *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus hyicus* (GILMOUR & HARVEY, 1990).

A enzima desoxirribonuclease termorresistente é produzida por 99% dos estafilococos coagulase positivos (PARK et al., 1980) e assim, torna-se um importante critério para a identificação de *Staphylococcus aureus*. Produção de hemolisina também pode ser observada pelas cepas de *Staphylococcus aureus* (DEBRIESE, 1980). A determinação das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termorresistente é comumente utilizada para indicar a existência de estafilococos enterotoxigênicos (VARADARAJ & RANGANATHAN, 1985).

O meio de cultura habitualmente utilizado para o isolamento é o de Baird-Parker (TATINI et al., 1984). É adicionado ao meio, uma solução de cloreto de sódio com gema de ovo e telurito de potássio. A gema de ovo é utilizada para verificar a presença da enzima lecitinase, observando-se a formação de halos de transparência ao redor das colônias devido a hidrólise da lecitina do ovo. O telurito de potássio é um agente inibidor para outros microrganismos, as cepas de estafilococos reduzem-no e apresentam-se negras e brilhantes no meio de cultura.

II-3 - ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÊNICOS

Vários experimentos têm sido realizados para correlacionar a produção de enterotoxinas com a produção das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termorresistente ou termonuclease (TNase) (NISKANEN & KOIRANEN, 1977; BENNETT et al., 1986). Apesar de muitos estafilococos enterotoxigênicos produzirem coagulase e TNase, a produção destas enzimas não implica que sejam enterotoxigênicos.

Alguns trabalhos relatam que pode ocorrer produção de enterotoxinas por linhagens coagulase positivas e negativas (EVANS and NIVEN, 1950; EVANS et al., 1950; THATCHER and GHODES, 1959).

Devido à existência de linhagens enterotoxigênicas coagulase negativas, a produção de TNase é reconhecida como o principal critério na identificação de *Staphylococcus aureus* (SPERBER, 1976). Aproximadamente 99% dos estafilococos são capazes de produzir a enzima TNase (PARK et al., 1980). A enzima é encontrada no meio onde ocorre o crescimento de *Staphylococcus aureus*. A sua produção, similar a produção de enterotoxinas, é afetada por alguns fatores como: temperatura, pH, atividade de água (LOMBAL, 1983) e outros.

As linhagens coagulase negativas, originalmente foram classificadas como estafilococos atípicos, pois não poderiam ser classificadas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ou *Staphylococcus saprophyticus* (LOTTER and GENIGEORGIS, 1975).

DANIELSON and HELLBERG (1977) citaram a produção de enterotoxina A, B e C₁ por estafilococos coagulase negativos, nenhum teste de TNase foi realizado. OLSVIK et al. (1982) reportaram a produção de uma ou mais enterotoxinas A, B ou C por linhagens coagulase negativas, classificadas como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*

e *Micrococcus luteus*. A reação de TNase foi positiva para *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*.

ADESIYN et al. (1984) demonstraram a ausência, através de testes sorológicos, de produção de enterotoxinas por linhagens de *Staphylococcus hyicus*. Entretanto, todas as linhagens produziram resposta emética em dois ou mais macacos utilizados para o ensaio biológico.

FUKUDA et al. (1984) constataram que 24% das 210 linhagens de *Staphylococcus intermedius* (coagulase e TNase positivos) isolados de cachorros, produziram uma ou mais enterotoxina A, B ou C.

CRASS and BERGDOLL (1986) relataram a produção de enterotoxinas A e C por linhagens de estafilococos coagulase e TNase negativas e por *Staphylococcus epidermidis*. Os autores também descreveram uma linhagem coagulase negativa isolada de frangos, responsável por um surto de intoxicação alimentar devido à produção de enterotoxina A, e à capacidade de produzir também a toxina da Síndrome do Choque Tóxico.

Assim, várias pesquisas foram realizadas para correlacionar a produção de enterotoxinas com outras características fenotípicas de *Staphylococcus aureus*.

Até o momento, nenhuma outra característica pode ser correlacionada com a produção de enterotoxinas (GENIGEORGIS, 1989).

II-4 - ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas que se apresentam sob vários tipos imunologicamente diferentes identificados como: enterotoxina A; B; C₁, C₂, C₃; D e E (BERGDOLL, 1990).

Muitos alimentos favorecem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e a formação de enterotoxinas, com exceção daqueles com valores baixos de pH (<5,0) ou atividade de água (aw) abaixo de 0,86. As enterotoxinas podem ser sintetizadas em uma ampla faixa de temperatura (10 - 45 °C, ótima 35 - 40 °C) (TRANTER, 1990).

O crescimento de *Staphylococcus aureus* e a produção de enterotoxinas podem ficar restritos devido à competição com outros microrganismos, por exemplo, os responsáveis pela deterioração dos alimentos crus ou fermentados. Entretanto, alimentos com aw baixa, como presunto, carnes defumadas e produtos que contenham cremes com açúcar, não favorecem o crescimento de bactérias deterioradoras e os estafilococos podem crescer, exceto se a temperatura de estocagem for inadequada a inibição do crescimento (TRANTER, 1990).

Enterotoxinas A e D, separadas ou conjuntamente, são as mais frequentemente envolvidas em surtos de intoxicação estafilocócica, provavelmente porque estas toxinas podem ser produzidas mesmo havendo grandes variações nas condições de crescimento (TRANTER, 1990).

A identificação das enterotoxinas é feita com base em suas reações com anticorpos específicos (CASMAN et al., 1963). No caso das enterotoxinas do grupo C, estas reagem com o mesmo anticorpo principal, mas cada uma reage também com anticorpos específicos, que permitem assim a identificação e isolamento (LEE et al., 1980), indicando que as estruturas individuais das

enterotoxinas C são diferentes, tanto a nível imunológico quanto a nível de padrão eletroforético.

As toxinas purificadas são moléculas pequenas, o peso molecular varia de 27,5 a 30 kD, são formadas por uma cadeia simples de polipeptídeos, com estrutura básica similar, todas possuem pontes dissulfeto presentes no centro da molécula (TRANTER, 1990).

Tabela 1: Características das Enterotoxinas Estafilocócicas

Tipo	Peso Molecular (D)*	Ponto Isoelétrico	Localização Gênica
A	27.100	8,1; 7,3	cromossomal
B	28.366	8,3; 8,6 9,1; 9,4	cromossomal/ plasmideal
C ₁	27.496	8,8; 9,2	cromossomal/ plasmideal
C ₂	27532	5,6; 6,9 7,5; 7,6	NC
C ₃	27.438	8,2	NC
D	26.360	8,4	plasmideal
E	26.425	8,0	cromossomal

NC- não conhecido

* - calculado pela sequência nucleotídica

Fonte: TRANTER (1990)

Segundo TRANTER (1990), a heterogeneidade observada na tabela, referente aos diferentes pontos isoelétricos, tem sido verificada em toxinas purificadas e pode ser resultado de deamidação das toxinas, naturalmente ou enzimaticamente, durante os processos de fermentação ou purificação.

II-4.a - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As enterotoxinas estafilocócicas são moléculas termoestáveis, resistem a uma temperatura de 121°C por 3 a 8 minutos, não sendo inativadas pela temperatura utilizada no processamento dos alimentos, embora o microrganismo seja facilmente destruído ($D_{60^{\circ}\text{C}} = 0,43$ a 8 minutos) (Baird-Parker, 1990). A inativação das enterotoxinas não depende somente da temperatura, mas também da composição e pH do meio que as contêm (TATINI, 1976).

Alguns estudos indicam que a perda da atividade imunológica é maior entre 70 a 80 °C do que entre 90 a 100 °C (TRANter, 1990). TATINI (1976) reportou que existe um aumento na atividade biológica das enterotoxinas após o tratamento térmico. Recentemente, SCHWABE et al. (1990) mostraram que a enterotoxina após ter sido completamente inativada por tratamento térmico, pode recuperar sua atividade biológica e imunológica após um ajuste do pH a 11,0 seguido por redução a pH 7,0.

As enterotoxinas no estado ativo são resistentes à ação das enzimas proteolíticas como a tripsina, quimiotripsina, renina e papaína (BERGDOL, 1972), apresentando assim, uma resistência superior à maioria das proteínas.

Com relação a inativação das enterotoxinas por radiações, alguns dados indicam que doses de 5 Mrad são necessários para a redução de 90% na atividade de enterotoxina B em tampão veronal, necessitando-se de uma dose quatro vezes superior para o mesmo efeito em leite (READ & BRADSHAW, 1967).

II-4.b - PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS

Teoricamente, uma simples célula de *Staphylococcus aureus* pode ser capaz de iniciar crescimento e produzir enterotoxinas em alimentos, se as condições forem adequadas ao microrganismo. Entretanto, para o *Staphylococcus aureus* crescer abundantemente nos alimentos, há de ser capaz de competir com outros microrganismos presentes (GOEPFERT and KIM, 1975).

Para os *Staphylococcus aureus* crescerem e produzirem enterotoxinas em determinado meio, alguns requerimentos nutricionais devem ser supridos, como fonte orgânica de nitrogênio (aminoácidos), fonte de energia (carboidratos), fontes de vitaminas (tiamina e niacina) e minerais. Outras condições devem ser adequadas, como atividade de água, pH, ausência de substâncias inibidoras, potencial de oxido-redução e temperatura (TATINI, 1973).

Tabela 2: Variações das Condições do Meio para Crescimento e Produção de Enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*.

Parâmetros	Crescimento		Produção de Enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
aw	> 0,99	0,83 - > 0,99	> 0,99	0,86 - > 0,99
pH	6 - 7	4 - 10	6 - 7	4 - 9,8
% NaCl	0	0 - 20	0	0 - 10
Disponibilidade de Oxigênio	aeróbio	aeróbio/ anaeróbio	aeróbia	aeróbia/ anaeróbia
Temperatura	37 °C	7 - 47,8 °C	40 - 45 °C	10 - 46 °C

Fonte: TATINI (1973)

Como pode ser observado na tabela, TATINI (1973) demonstrou que a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus* ocorreu entre 10 a 46° C e a temperatura ótima foi de 40 a 45°C. Utilizando o meio de cultura BHI para o crescimento do microrganismo, Mc LEAN et al. (1968) verificaram que após 112 horas de incubação em temperaturas de 16, 20 ou 37°C, o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi similar, mas a quantidade de enterotoxina B sintetizada diminuiu consideravelmente com a diminuição da temperatura. O nível de enterotoxina B detectada foi 8, 20 e 340 µg/mL a 16, 20 e 37°C, respectivamente.

DONELLY et al. (1968) mostraram que em leite pasteurizado inoculado com *Staphylococcus aureus* (10⁴ UFC/mL) foi detectada enterotoxina A após 12 horas, quando incubado a 35°C. A toxina foi detectada após 18, 24 e 48 horas quando o leite foi incubado a 30, 25 e 20°C, respectivamente, não sendo observado crescimento ou produção de enterotoxinas após 168 horas a 10°C.

BARBER and DEIBEL (1972) demonstraram que valores baixos de pH favoreceram a síntese de enterotoxinas A, B, C₂ e E, quando as culturas eram incubadas em aerobiose no meio de BHI (Brain Heart Infusion) em pH 4,9; 5,0; 4,9 e 4,8, respectivamente. Em anaerobiose o pH mínimo para a produção das enterotoxinas A, B, C₂ foi 5,7, enquanto que o mínimo para a enterotoxina E foi 5,0. Foi observado em outras linhagens, que a produção de enterotoxina A ocorreu na faixa de pH entre 4,9 a 5,7, em aerobiose e 5,7 a 7,0, em anaerobiose.

Segundo PEREIRA et al. (1982), a presença de glicose no meio resulta em um abaixamento do pH, devido aos produtos de metabolismo da glicose. Estudos realizados com glicose adicionada ao meio de cultura mostraram haver diminuição na produção de enterotoxinas, em parte devido ao decréscimo de pH, uma vez que níveis mais elevados de toxina foram conseguidos em meios tamponados com pH superior a 5,6.

TATINI (1973) reportou que a produção de enterotoxina é máxima na ausência de NaCl, mas pode ocorrer em uma concentração até 10%. Em concentrações de 4% de NaCl e pH 6,0, após 72 horas de incubação, a produção de

enterotoxina B foi diminuída em 89,5% e não foi observada a produção de enterotoxina A sob essas condições (PEREIRA et al., 1982).

A atividade de água (a_w) ótima para que *Staphylococcus aureus* cresça é maior que 0,99, variando de 0,83 a acima de 0,99 (TATINI, 1973). O requerimento para a produção de enterotoxinas é similar, com uma variação de 0,86 a >0,99 e um ótimo acima de 0,99. Quando parâmetros nutricionais e ambientais são otimizados, o crescimento de estafilococos pode aumentar, mesmo havendo a redução de a_w . Quando estes parâmetros afastam-se do ótimo, a a_w mínima tolerada por *Staphylococcus aureus* eleva-se (SMITH et al., 1982).

MORITA et al. (1979) reportaram que a adição de íons magnésio ao meio de caseína hidrolizada estimulou a produção de enterotoxina B e C, mas não observaram a síntese de enterotoxina A. Adição de Fe^{++} aumentou a síntese de enterotoxina B, mas não influenciou os níveis de enterotoxinas A e C. Keller et al. (1978) constataram que aumentando os níveis de Mg^{++} (0,4 a 1,5 mM), PO_4^{-3} (1,44 a 2,87 mM) ou K^+ (1,5 a 30 mM) duplicou-se a produção de enterotoxina B. Adição de outros metais não afeta a produção de enterotoxina B.

II-4.c - AÇÃO BIOLÓGICA DAS ENTEROTOXINAS

O quadro clínico apresentado por indivíduos que tenham ingerido enterotoxinas estafilocócicas é caracterizado por vômitos incoercíveis, diarreia e mal estar generalizado, após um período de incubação entre 4 a 6 horas. Este quadro pode ser agravado, quando indivíduos muito jovens, idosos ou fisiologicamente debilitados são expostos à ação destas toxinas. Os sintomas desaparecem rapidamente em 24 horas (BERGDOLL, 1983).

Os ensaios imunológicos são úteis na detecção de enterotoxinas nos alimentos, mas não distinguem a atividade biológica da toxina inativa. A atividade biológica das enterotoxinas somente pode ser observada quando administrada em animais. Muitos animais, com exceção de gatos e macacos, são moderadamente insensíveis às enterotoxinas. Todas as enterotoxinas estafilocócicas causam emese em macacos após a administração intragástrica ou intravenosa, com uma dose de 5 - 10 μ g e 20 - 500 ng por animal, respectivamente (TRANTER, 1990).

O alvo de ação das enterotoxinas é o trato digestivo, mas outras alterações na pressão arterial e temperatura indicam a passagem das enterotoxinas do estômago e trato intestinal para o sistema circulatório, em níveis muito baixos (BERGDOLL, 1983).

A resposta emética é devido a estímulo de receptores eméticos localizados no intestino e transmitido ao cérebro via vago e nervos simpáticos. Após a realização de ensaios em animais submetidos a vagotomia e simpatectomia, observou-se não haver resposta à ação das enterotoxinas (TRANTER, 1990).

O mecanismo de diarreia pode ser atribuído à inibição da absorção da água ou aumento do fluxo do líquido transmucoso do lúmen intestinal. O sintoma de diarreia não foi constatado pelo método da alça de íleo ligado em coelhos (BERGDOLL, 1970). Estudos feitos em ratos demonstraram que a

enterotoxina atravessa completamente a parede intestinal, indo para a corrente circulatória antes de sua eliminação pelos rins (BEERY et al., 1984).

Recentemente, tem sido estudado o papel das enterotoxinas como "superantígenos", estes podem causar a ativação e proliferação dos linfócitos T, e podem estimular a produção de vários mensageiros químicos, incluindo interferon, interleucina-1 e fator necrosante tumoral (MARRACK and KAPPLER, 1990). TRANTER (1990) sugeriu que estas observações podem contribuir para um melhor entendimento da ação das toxinas. Por exemplo, a possibilidade que a ativação de células T acompanhada pela secreção de linfocinas seja responsável por alguns dos efeitos patológicos causados pelas toxinas no homem, incluindo vômito, diarreia e choque.

II-4.d - DETECÇÃO DAS ENTEROTOXINAS

II-4.d.1 - Métodos Biológicos

Estes métodos incluem administração intraperitoneal ou intravenosa de soluções com concentração variável de enterotoxinas em gatos e administração oral em macacos Rhesus (VARADARAJ and RANGANATHAN, 1989).

O método mais eficaz para o diagnóstico de enterotoxinas é o ensaio biológico utilizando macaco Rhesus (*Macaca mulatta*); entre os diferentes tipos de toxinas produzidas pelos estafilococos, somente as enterotoxinas provocam vômitos em macacos, sendo que outros produtos celulares liberados pelo microrganismo não interferem com os resultados do teste, não havendo portanto, necessidade do tratamento da amostra antes de ser administrada aos animais (SURGALLA et al., 1953).

II-4.d.2 - Métodos sorológicos

Atualmente, vários métodos imunológicos têm sido desenvolvidos com especificidade e sensibilidade diferentes.

Entre as várias técnicas conhecidas, as mais utilizadas são: imunodifusão simples e dupla em gel e imunomicrodifusão em lâmina (CASMAN and BENNETT, 1965; MEYER and PALMIERIM 1980).

O limite de detecção para o método de dupla difusão em gel situa-se ao redor de 0,5 µg/mL, quando se utiliza o método modificado de Ouchterlony para placas de sensibilidade ótima (OSP) (ROBBINS et al., 1974).

Para o micro método em lâmina, estes limites estendem-se até 0,1 µg/mL (CASMAN et al., 1969).

A desvantagem dos métodos citados está em sua pouca sensibilidade, uma vez que pode ocorrer a produção de enterotoxinas estafilocócicas em concentrações ao redor de 1ng/mL ou menos (KOKAN and BERGDOLL, 1987), podendo provocar intoxicação alimentar, como foi reportado por EVENSON et al. (1988), ao ser consumido leite achocolatado, distribuído em embalagens de 250 mL. A análise de enterotoxinas no leite revelou índices médios de 94 a 184 ng de enterotoxina A por embalagem. Há, portanto, a necessidade da utilização de técnicas mais sensíveis, rápidas e que possam ser aplicadas diretamente a extratos de alimentos (FUNG et al., 1973).

Um método proposto por FUJIKAWA and IGARASHI (1988) é sensibilizar o látex com partículas de alta densidade para utilizar junto ao teste de aglutinação passiva reversa em látex. O teste é rápido, específico e sensível; o limite de detecção está em torno de 0,5 ng/mL.

Um outro método utilizado é o radioimunoensaio (ORTH, 1977). O princípio deste método baseia-se na competição entre enterotoxina marcada com I ¹²⁵ e não marcada, pelo sítio de ligação de anticorpos que foram adsorvidos na parede interna de tubos de poliestireno. A sensibilidade deste método varia entre 1,0 a 5,0 ng/mL (JOHNSON et al., 1971). A desvantagem deste método é a necessidade de manipulação de substâncias radioativas e a utilização de equipamentos sofisticados como é o caso do cintilógrafo.

Entre os vários métodos de detecção de enterotoxinas, um dos mais promissores, é a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) (FREED et al., 1982; SAUNDERS and BARTLETT, 1977).

O método ELISA é um ensaio simples, similar ao radioimunoensaio, exceto quanto ao tipo de marcador utilizado, que é uma enzima ao invés de material radioativo.

A enzima pode ser conjugada com a enterotoxina como descrito no método competitivo de ELISA (STIFFLER-ROSENBERG and FEY, 1978) ou conjugada ao anticorpo (IgG) como no método "sandwich" (SAUNDERS and BARTLETT, 1977). Ambos os métodos são realizados usando-se uma fase sólida em tubos ou placas de poliestireno revestidos com imunoglobulinas anti-enterotoxina estafilocócica. Após incubação com a amostra, a quantidade de toxina adsorvida é mensurada usando uma anti-enterotoxina conjugada a uma enzima ("sandwich") ou enterotoxina conjugada a uma enzima (ELISA competitivo) (FREED et al. , 1982). A sensibilidade do método "sandwich" está em torno de 0,1 ng de enterotoxina/mL (FEY et al., 1984). As enzimas utilizadas no preparo do conjugado podem ser peroxidase (FREED et al., 1982), fosfatase (FEY et al., 1984) e β -amilase (MORITA & WOODBURN, 1978).

Vários fatores como a sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, custo, disponibilidade de equipamentos e técnicos especializados, rapidez e o número de amostras a serem testadas, devem ser considerados antes da escolha do ensaio.

II-5 - INCIDÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENTEROTOXIGÊNICOS

Segundo BERGDOLL (1979), a verdadeira incidência de intoxicação estafilocócica nos Estados Unidos e em outros países é desconhecida, uma vez que esta doença não é relatada aos serviços médicos e sanitários de forma compulsória.

Dos alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos por intoxicação estafilocócica, estão incluídos a carne cozida, peixes, aves, produtos de padarias (especialmente aqueles com creme), leite e seus derivados, frutas, vegetais e saladas. Manipuladores de alimentos infectados e mal treinados em técnicas de assepsia são os maiores veiculadores do microrganismo nos alimentos, vindo a causar os surtos (TRANTER, 1990).

Em 1914, demonstrou-se que os estafilocos eram capazes de causar intoxicação alimentar, devido ao consumo de leite de vacas mastíticas. Na época, ele observou que uma substância tóxica produzida pelos estafilococos foi a responsável pela intoxicação; hoje, sabe-se que a substância tóxica é uma das enterotoxinas. (BERGDOLL, 1979).

Recentemente, no Brasil, foram relatados alguns surtos ocorridos na região de Belo Horizonte, onde os alimentos envolvidos foram bolos confeitados e queijo tipo "Minas" (SABIONI et al., 1988; CARMO et al., 1990 e PEREIRA et al., 1991).

Estudos feitos por FREITAS e MAGALHÃES (1990) demonstraram que o *Staphylococcus aureus* é um dos maiores causadores de mastite bovina, com índice elevado de infecção no rebanho leiteiro bovino. No entanto, nos últimos anos foram encontradas evidências de que outras espécies de *Staphylococcus* (por exemplo *Staphylococcus hyicus*) podem ser potencialmente

patogênicas para humanos pela produção de enterotoxinas e agentes causais de mastites ou doença na pele de animais leiteiros (GILMOUR & HARVEY, 1990).

O *Staphylococcus aureus* é frequentemente encontrado no úbere de vacas, podendo assim contaminar o leite durante a ordenha (MATOS et al., 1991). Outros fatores que propiciam a contaminação do leite e devem ser levados em consideração são a ubiquidade do *Staphylococcus aureus* na natureza e o baixo nível sócio-econômico dos ordenhadores, geralmente possuidores de hábitos higiênicos não salutareis (WILSON, 1977), bem como as práticas de resfriamento, pasteurização e distribuição deficientes.

CASMAN et al. (1967) evidenciaram que a incidência de produção de enterotoxinas por linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de humanos foi de 47% para o isolado de material clínico e 31% para material não clínico. A incidência de enterotoxigenicidade entre estafilococos isolados de animais é geralmente menor, embora possa variar com a origem da linhagem. Assim, WIENEKE (1974) e HARVEY & GILMOUR (1985) observaram incidências de 3,9 a 6,0% para linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas normais comparado com 14,6 a 41,3% de linhagens isoladas de vacas mastíticas (OLSON et al., 1970; NISKANEN & KOIRANEN, 1977;). HARVEY & GILMOUR (1988) reportaram uma incidência de 35% para linhagens isoladas de leite de ovelhas saudáveis, enquanto GUITIERREZ et al. (1982) e DE BUYSER et al. (1987) encontraram incidências de 83% e 70% para *Staphylococcus aureus* isolados de ovelhas e cabras mastíticas, respectivamente. OLSVIK et al. (1981) sugeriram que a incidência de enterotoxinas produzidas por linhagens isoladas de animais pode até ser mais elevada do que geralmente supõe-se. A porcentagem encontrada por ele foi de 69,6% de linhagens de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isoladas de várias infecções em vacas, prevalecendo a produção de enterotoxina tipo C.

EL-DAIROUTY (1989) relatou uma série de surtos de intoxicação ocorridos no Egito durante 1986, devido ao consumo de leite em pó desnatado importado. Análises bacteriológicas foram realizadas em 02 amostras das sobras do leite que provocou o surto e em 90 amostras do leite em pó importado. A presença de células viáveis de estafilococos não foi confirmada no leite. Entretanto,

enterotoxinas estafilocócicas do tipo A e B foram detectadas nas amostras referentes às sobras de leite, na concentração de 0,125µg e 1,5µg por 100g de amostra, respectivamente. Em 3 amostras daquelas que representavam o leite em pó importado presente no mercado, encontrou-se enterotoxina do tipo B, na concentração de 1,25 µg/100g. Enterotoxina A também foi detectada em 1 das 3 amostras citadas.

Vários surtos de intoxicação estafilocócica ocorreram nos Estados Unidos em 1989, como resultado do consumo de cogumelos enlatados importados da China (HARDT-ENGLISH et al., 1990 e BRUNNER and WONG, 1992).

Em 1986 foi divulgado um surto de gastroenterite ocorrido na Califórnia. Os sintomas foram devido à ingestão de enterotoxinas estafilocócicas A e C presentes em macarrão 'tortellini' consumido durante uma refeição oferecida aos participantes de uma Conferência Literária. (BRYANT et al., 1988).

BRECKINRIDGE and BERGDOLL (1971) relataram uma intoxicação, provocando gastroenterite aguda, devido à presença no alimento de enterotoxinas, produzidas por linhagens de estafilococos coagulase negativas.

A incidência de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos e suas enterotoxinas em diversos alimentos, tem sido constatada. UMOH (1988) encontrou 6,5% de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de produtos fermentados de leite da Nigéria. Das linhagens enterotoxigênicas encontradas, 73% produziram enterotoxina A, 10,8% enterotoxina B, 10,8% enterotoxina C e 2,7% produziram conjuntamente as enterotoxinas A e B e A e C.

NANU and NARAYAN (1992) isolaram estafilococos enterotoxigênicos de carne de porco e salame, evidenciando a produção de enterotoxinas B, C e D por linhagens coagulase positivas e negativas.

A habilidade de 135 linhagens de estafilococos enterotoxigênicos isolados de presunto defumado da Espanha, em produzir enterotoxinas foi investigado por MARIN et al. (1992), que verificaram uma alta porcentagem de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos (85,9%), sendo que 54,3% destas linhagens foram produtoras de enterotoxina A. Uma das duas linhagens de *Staphylococcus epidermidis* isoladas produziu enterotoxina C.

No estudo realizado por NG and TAY (1993), em 111 amostras de bebidas e alimentos contaminados em Singapura, demonstrou-se que houve predominância da produção de enterotoxina B pelas linhagens de estafilococos isoladas. Outros pesquisadores têm verificado que a maioria das linhagens enterotoxigênicas provenientes de amostras de alimentos produzem predominantemente enterotoxina A (UMOH et al., 1988; SOKARIE and ANOZIE, 1990).

Estudos de portadores de *Staphylococcus aureus*, com finalidade epidemiológica, vêm sendo realizados na tentativa de se estabelecer uma possível ligação entre *Staphylococcus aureus* por eles albergados, sua disseminação e perpetuação de cepas resistentes que se propagariam no ambiente familiar ou de trabalho (RADDI et al., 1988). As fossas nasais têm sido relatadas como a fonte mais importante de disseminação (IARIA et al., 1980).

Segundo RADDI et al. (1988), os manipuladores de alimentos podem, através do contato direto ou por perdigotos, perpetuar a cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica.

Os portadores nasais podem, por meio das mãos, desempenhar papel importante na disseminação do microrganismo, principalmente através dos alimentos por eles manuseados. RADDI et al. (1988) verificaram em 48 manipuladores de alimentos residentes na cidade de Araraquara - SP e 20 estudantes universitários, 44,1% e 34,8% portadores de *Staphylococcus aureus* em fossas nasais e mãos, respectivamente. Dados da literatura indicam uma prevalência de *Staphylococcus aureus* em portadores nasais saudáveis de 10 a 50%, e em

pacientes e funcionários de hospitais de 60 a 80% (KLOOS, 1980; POLLEDO et al, 1985).

III- MATERIAIS E MÉTODOS

III-1 Materiais

III-1.a - Amostragem

Foram analisadas 140 amostras de leite cru de bovino, fornecidas por uma cooperativa de produtores de leite localizada na região de Campinas-SP. O período de análise foi de 10 meses, e as amostras analisadas eram provenientes de 9 produtores e um pool (combinação) de todo o leite recolhido no dia da coleta.

O leite era acondicionado em latões de plástico e transportado até a cooperativa através de caminhões abertos, não havendo um sistema adequado de refrigeração. O tempo médio do transporte era de 3 horas.

III-1.b - Meios de Cultura

- Meio diferencial e seletivo Baird-Parker (Difco), adicionado de telurito de potássio e gema de ovo.
- Meio de enriquecimento: Infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco)
- Base Ágar Sangue (BBL)
- Ágar Vermelho de Fenol (Difco)
- Meio para a produção de enterotoxinas - Triptona (Difco)3% e Extrato de Levedura (Biobrás)1%.

III-1.c - Reagentes Para Testes Bioquímicos

- Reativos para coloração de Gram
- Plasma Liofilizado de Coelho
- Complexo Ágar-DNA-azul de Toluidina
- Peróxido de Hidrogênio 3%

III-1.d - Reagentes para Análise de Enterotoxinas

- Padrões de enterotoxinas estafilocócicas tipo A, B, C e D fornecidas pelo Dr. Merlin S. Bergdoll (FRI, Wisconsin, EUA).
- Anti-soros das respectivas enterotoxinas fornecidos pelo Dr. Merlin S. Bergdoll (FRI) e alguns produzidos pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
- Ágar Noble (Difco)
- Tampão TRIS 0,05 M pH=7,4.

III.1.e - Equipamentos Utilizados

- Potenciômetro de pH, Corning Digital 110 de escala expandida em resolução de 0,01.

- Centrífuga refrigerada, modelo IEC B-20 A, (International Equipment, USA).
- Liofilizador de Bandeja, modelo LK-4, (Edwards do Brasil).
- Balança Semi-Analítica digital BEC 1000, (Acatec).
- Estufa C. B. Retilínea (Fanem Ltda.).
- Estufa de Secagem e Esterilização, Mod. 320-SE (Fanem Ltda.).
- Bomba a Vácuo (Tecnal).
- Fluxo Germicida (Veco).
- Autoclave, Mod. 104 (Fabbe Ltda).

III-2 - MÉTODOS

III-2.a - Pesquisa de Estafilococos Enterotoxigênicos

. Coleta das Amostras:

As amostras foram coletadas em frascos previamente esterilizados e transportadas ao laboratório acondicionadas em isopor com gelo.

III-2.b - Contagem, Isolamento e Identificação

As amostras de leite foram submetidas à contagem do número de estafilococos presentes, através da técnica de plaqueamento em superfície.

Aliquotas das diluições decimais preparadas foram plaqueadas na superfície de placas de Petri, contendo o meio de Baird-Parker adicionado de solução de gema de ovo e telurito de potássio (Tatini et al., 1984).

Foram utilizadas duas alíquotas de 0,3 mL e uma de 0,4 mL de cada diluição para plaqueamento, totalizando assim, 1,0 mL de semeadura.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foram enumeradas em conjunto as 3 placas utilizadas para uma diluição, obtendo-se o resultado direto em 1,0 mL. Procedeu-se a contagem de colônias negras, brilhantes e circundadas por halo claro que evidencia a reação de lecitinase. Foram isoladas ao acaso, em média 15% da soma total das três placas.

Os isolados mantidos em BHI ágar foram analisados microscopicamente, fazendo-se esfregaços corados pelo método de Gram, observando-se assim, sua morfologia. Para as culturas que se apresentaram microscopicamente como cocos Gram positivos e agrupados em forma de cachos efetuaram-se as provas de produção de catalase, de coagulase livre, de DNase termossensível e termorresistente (Tatini et al., 1984).

III-2.b.1 - Coloração de Gram

A coloração pelo método de Gram foi realizado de acordo com Pelczar et al. (1981).

III-2.b.2 - Catalase em Lâmina

Com o auxílio de uma agulha microbiológica previamente flambada, foi retirado material dos isolados em BHI ágar e depositado em lâmina, foi então colocada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% sobre o material e homogeneizado. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de borbulhas.

III-2.b.3 - Produção de Hemolisina

Para a detecção de hemólise foi utilizado meio base ágar sangue adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Foram colocados 20 mL do meio em placas de 15 X 120 mm. Após a solidificação do ágar, os isolados em BHI ágar foram repicados no meio com auxílio de uma agulha microbiológica previamente flambada. A seguir foram incubados a 37 °C por 24 horas.

A hemólise foi observada após as 24 horas de incubação e também foi feita a observação após um período de 24 horas à temperatura de 5 °C.

III-2.b.4 -Produção da Enzima Coagulase em Tubo

O teste de coagulase dos isolados foi realizado após o cultivo das cepas em tubos de ensaio contendo caldo BHI, incubados a 37 °C por 24 horas. Após este período de incubação, 0,2 mL do cultivo foi adicionado em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma liofilizado de coelho, reconstituído com água destilada estéril ao volume inicial e incubados a 37 °C por 6 horas, sendo observados com intervalos de 1 hora.

O resultado foi considerado positivo quando houve formação de coágulo firme (4+ ou 3+) (SPERBER and TATINI, 1975).

III-2.b.5 - Fermentação do Manitol

A prova de fermentação do manitol foi realizada para todas as cepas que foram negativas aos testes de coagulase e TNase. Foi utilizado o meio base ágar vermelho de fenol adicionado de 1% de manitol. Os isolados foram repicados em tubos contendo 5 mL do meio e selados com uma camada de ágar bacteriológico de cerca de 1 centímetro e incubados a 37 °C . Após o período de incubação foi observado a mudança da coloração do meio de vermelho para amarelo.

A leitura da fermentação em manitol foi feita até 5 dias de incubação.

III-2.b.6 - Produção da Enzima Desoxirribonuclease Termorresistente

O princípio desta reação é a mudança de coloração azul apresentada pelo complexo ágar-DNA-azul de toluidina, para coloração rósea, pela ação da enzima desoxirribonuclease que hidrolisa o ácido desoxirribonucleico (BENNETT, 1971).

Para a realização deste teste foram utilizadas lâminas de vidro recobertas pela mistura ágar-DNA-azul de toluidina. As lâminas preparadas foram guardadas em câmara úmida a 4°C. Antes da realização do teste, com auxílio de uma bomba à vácuo foram feitos orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro, dispostos em fileira dupla e distanciados 1 cm dos orifícios adjacentes.

Após este procedimento, 1 gota das culturas previamente repicadas em caldo BHI por 24 horas e incubadas a 37°C foram retiradas com pipeta estéril e colocadas nos orifícios superiores, e outra parte da cultura após aquecimento em banho de água em ebulição durante 15 minutos, foi adicionada nos orifícios inferiores. A seguir as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C. Após 4 horas, procedeu-se à leitura, verificando-se a hidrólise de DNA através da formação de um halo róseo ao redor dos orifícios inoculados.

O resultado foi considerado positivo quando houve formação de halo tanto para a cultura antes de ser aquecida, quanto na cultura submetida ao aquecimento.

III-3 - Produção de Enterotoxinas Estafilocócicas

O método utilizado para a produção de enterotoxinas estafilocócicas foi o de cultura em papel celofane sobre o meio de 3% de triptona, 1% extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico em pH 7,0 (Robins et al., 1974).

Este procedimento utiliza placas de Petri de 15 X 120 mm de diâmetro, recobertas com 20 mL do meio de cultura citado.

Após a solidificação do meio de cultura foi colocado papel celofane, previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 120 °C, e sobre este foi inoculado 0,1 mL da cultura jovem mantida em caldo BHI.

As placas assim preparadas foram incubadas à 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação a massa celular e os produtos metabólicos contidos na membrana de celofane foram removidos. Para a remoção, a membrana foi lavada com 2 mL de tampão TRIS 0,05M pH 7,4.

Obteve-se então, uma suspensão que foi centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos.

Para a análise de enterotoxinas foram utilizados os sobrenadantes.

III-4 - Detecção de Enterotoxinas

O método utilizado para a detecção de enterotoxinas foi o de dupla difusão em gel (Ouchterlony, 1949), sendo feita a determinação qualitativa das enterotoxinas.

A vantagem deste método é que pode ser feita uma comparação entre vários antígenos simultaneamente.

Este procedimento utiliza lâminas de microscopia, recobertas com 3,0 mL de ágar Noble 1,2%, preparado com tampão TRIS 0,05M pH 7,4, e filtrado a quente em funil de Buchner com o auxílio de vácuo.

Após a solidificação, o ágar foi perfurado, utilizando-se um molde padronizado.

Ao orifício central foi adicionado anti-soro referente à respectiva enterotoxina a ser testada. Sendo que as enterotoxinas testadas foram as enterotoxinas estafilocócicas A (EEA), B (EEB), C (EEC) e D (EED).

Nos orifícios superior e inferior foi adicionado antígeno padrão ao respectivo anti-soro, na concentração de 4 µg/mL e nos orifícios laterais foram adicionados os sobrenadantes obtidos das linhagens a serem testadas (figura 01).

As lâminas assim preparadas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 24 horas. A câmara úmida foi obtida recobrindo-se uma placa de Petri de 15 X 120 mm com algodão umidificado com água destilada.

Após o período de incubação, as placas foram observadas sobre um fundo opaco com luz indireta e difusa, utilizando-se uma lupa para facilitar a visualização das linhas de precipitação. Também foi utilizada solução de ácido fosfórico 0,1M para recobrir a lâmina quando a visualização das linhas não era perfeitamente nítida.

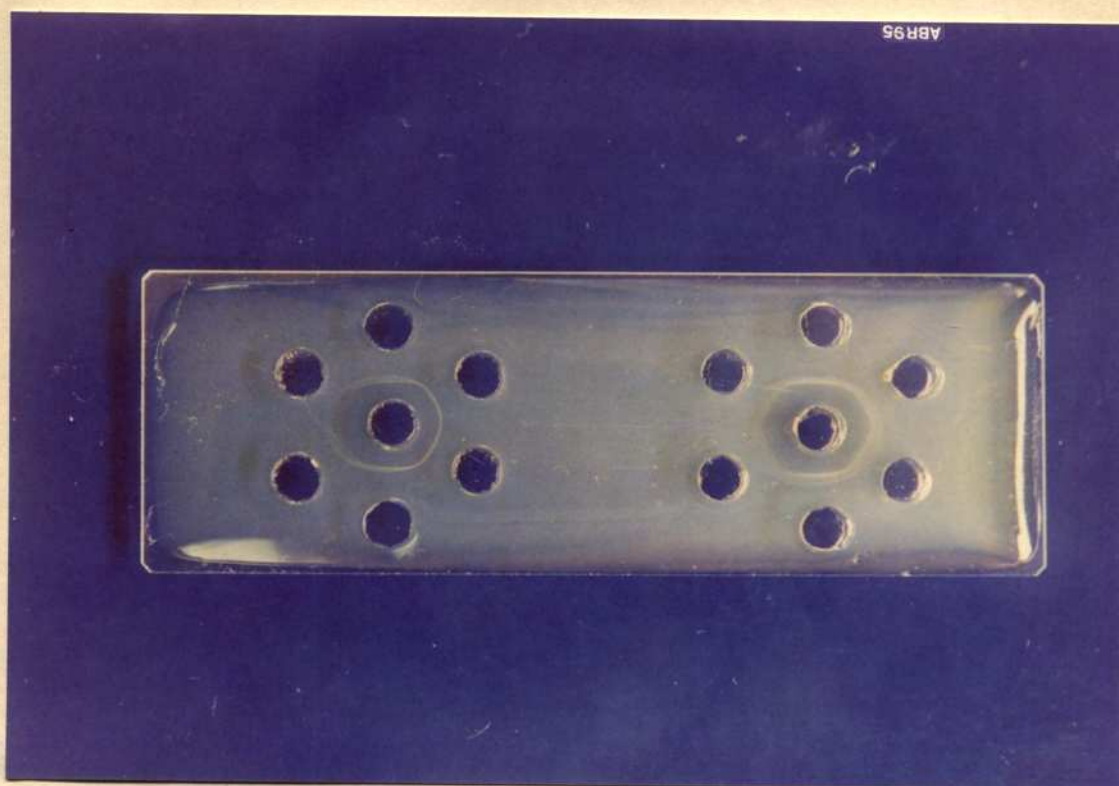


Figura 01 - Teste de imunodifusão dupla radial em lâmina. As linhas de precipitação podem ser observadas ao redor do orifício central, contendo anti-soro na diluição 1:20 e nos orifícios superior e inferior, solução padrão de enterotoxina na concentração de $4\mu\text{g/mL}$.

III-5 - Detecção de Enterotoxinas nos Sobrenadantes Concentrados

Todos os isolados foram testados para a obtenção de enterotoxinas como descrito no item III-4, e reensaiados após a concentração dos sobrenadantes, com o objetivo de detectar-se cepas baixo produtoras de enterotoxinas.

Os sobrenadantes foram transferidos para frascos de 10 mL e liofilizado em liofilizador de bandeja. Para a análise de enterotoxinas, o liofilizado foi ressuscitado ao volume de 0,2 mL em tampão TRIS 0,05M pH 7,4, correspondendo a uma concentração de 10 vezes ao volume inicial.

III-6 - Análise Estatística

A análise estatística das taxas de respostas quanto a enterotoxigenicidade de estafilococos em leite bovino, em sobrenadantes de culturas concentradas ou não, foi realizada através do teste de Goodman para Contrastes Entre e Dentro de Proporções Multinomiais (GOODMAN, 1964 e 1965). Procedimento semelhante foi adotado para a análise das proporções de respostas quanto a produção ou não das enzimas coagulase e desoxirribonuclease termorresistente (Tnase) por estafilococos enterotoxigênicos.

Nas tabelas dos resultados da análise, as linhas configuram as distribuições multinomiais (produtores) e as colunas suas classes (enterotoxigenicidade ou produção de enzimas).

Para as comparações entre proporções multinomiais (linhas) foram colocadas letras minúsculas ao lado das respectivas proporções para indicar as diferenças significativas existentes. Para as comparações dentro das multinomiais

(colunas) foram colocadas letras maiúsculas abaixo das proporções.

A interpretação das letras é feita da seguinte forma:

- Na comparação das linhas, isto é, as amostras dos produtores de leite, fixam-se as colunas (respostas estudadas) e, proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si.
- Na comparação das colunas, fixam-se as linhas e, proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula são semelhantes estatisticamente.

As conclusões da análise estatística foram realizadas ao nível de 0,05 de significância.

IV- RESULTADOS

IV.1 - Quantidade de Amostras de Leite Cru de Bovino Testadas, Contagem de Estafilococos e Características Morfológicas e Bioquímicas das Culturas.

Na tabela 01 estão distribuídas as 140 amostras de leite cru de bovino de acordo com os produtores, e a média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estafilococos por mL de material.

Tabela 01 - Quantidade de Amostras de Leite Cru de Bovino por Produtor e Média da Contagem de Estafilococos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

PRODUTOR	Nº DE AMOSTRAS	CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS UFC/mL
Pool	15	$5,2 \times 10^4$
02	15	$3,3 \times 10^4$
03	13	$1,5 \times 10^5$
04	15	$1,7 \times 10^4$
05	13	$2,2 \times 10^4$
06	15	$1,5 \times 10^4$
07	12	$1,2 \times 10^4$
08	13	$2,2 \times 10^4$
09	14	$8,9 \times 10^3$
10	15	$2,2 \times 10^4$

A presença deste microrganismo no leite foi verificada através da identificação morfológica das colônias e reações bioquímicas. Em todas as amostras foram encontradas cepas com características presuntivas de estafilococos enterotoxigênicos, como descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (1984).

Pode-se observar que a média das contagens de estafilococos efetuadas nas amostras de leite variou de $8,9 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Na figura 02 podem ser verificadas as características culturais das colônias. O meio de cultura utilizado foi o de Baird-Parker, contendo gema de ovo e telurito de potássio, o que dá ao meio seu caráter diferencial e seletivo.

As cepas selecionadas apresentaram colônias pretas, devido à redução do sal de telurito de potássio, pequenas e brilhantes, circundadas por um halo claro de transparência devido à ação da enzima lecitinase, responsável pela hidrólise da lecitina presente na gema de ovo. Todos os isolados destas culturas mostraram-se positivos ao teste de coloração de Gram e com morfologia e arranjo celular típico.

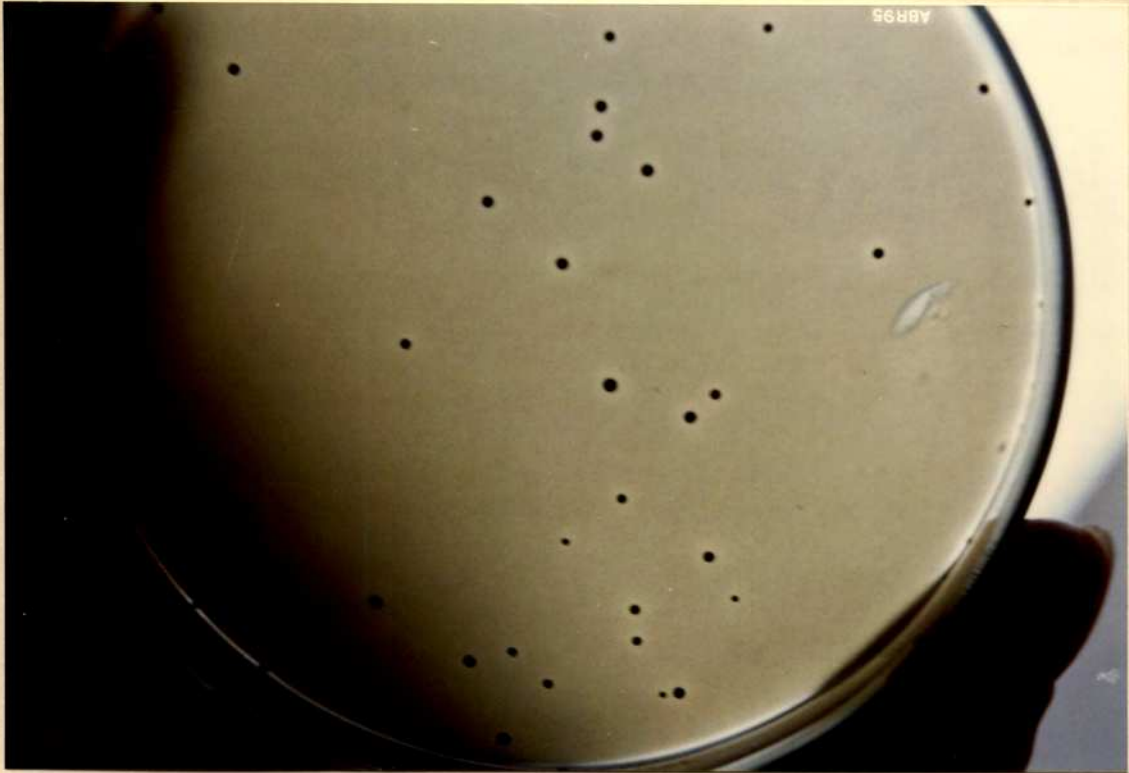


Figura 02 - Colônias típicas de estafilococos enterotoxigênicos isoladas a partir de uma diluição de leite em meio Baird-Parker, evidenciando-se as características culturais, cor e aspecto das colônias com halo de transparência devido à lecitinase.

Com relação a produção de catalase, entre 574 isolados, foram encontradas 33 cepas que apresentaram respostas negativas a este teste, e 15 destas foram produtoras de enterotoxina estafilocócica do tipo D (EED).

Quanto a produção das enzimas coagulase, termonuclease (Tnase) e hemolisina, encontraram-se isolados positivos e negativos aos testes. Os dados referentes a estes testes estão melhor detalhados nos itens que se seguem.

Na figura 03 pode-se observar halos cor de rosa, indicando a presença da enzima TNase produzida pela maioria das culturas testadas.

O teste de fermentação de manitol em anaerobiose foi realizado apenas para os isolados que apresentaram respostas negativas aos testes de coagulase ou Tnase. Todos os isolados analisados fermentaram o manitol em anaerobiose, diferenciando-se do gênero *Micrococcus*, estritamente aeróbio.

IV. 2 - Enterotoxinas Estafilocócicas Produzidas por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes não Concentrados.

Foram analisadas e testadas para produção de enterotoxinas 574 cepas de estafilococos isoladas das 140 amostras de leite.

Do total de isolados, 314 ou 54,7% mostraram-se enterotoxigênicos, produzindo pelo menos um tipo de enterotoxina.

Pela tabela 02 observa-se que 0,3% das cepas produziram EEA, 1,0% produziu EEB e , uma alta porcentagem de isolados, 95,2%, produziram EED.

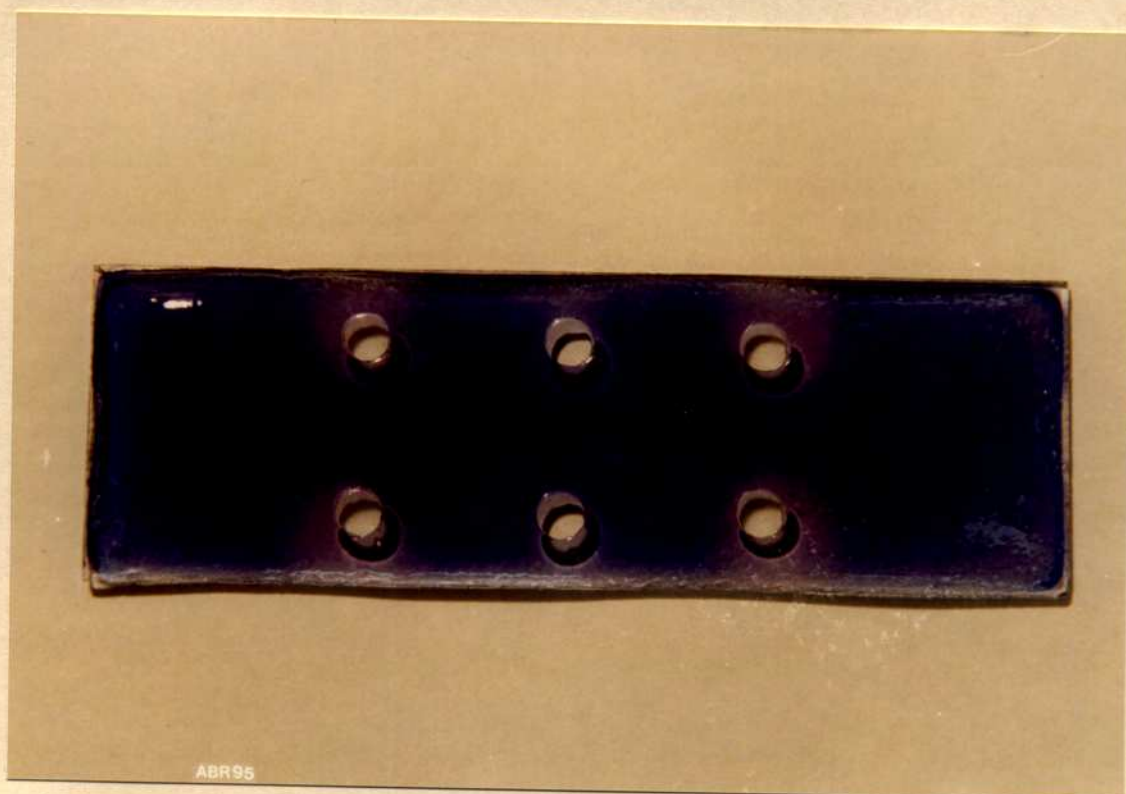


Figura 03 - Teste verificando a produção da enzima desoxirribonuclease termossensível e termorresistente. Pode ser observado halo róseo ao redor dos orifícios, indicando a positividade do teste.

Tabela 02 - Tipos de Enterotoxinas Estafilocócicas Produzidas por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Não Concentrados.

Nº DE ISOLADOS TESTADOS	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS %	TIPOS DE ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS %						
		A	B	C	D	A-B	A-D	B-D
574	54,7	0,3	1,0	nd*	95,2	0,3	1,6	1,6

* nd - não detectada

Algumas das linhagens testadas produziram mais de um tipo de enterotoxinas, EEA e EEB, EEA e EED, EEB e EED com valores de 0,3%; 1,6% e 1,6%, respectivamente. A enterotoxina do tipo C não foi detectada antes da concentração dos sobrenadantes de cultura.

IV. 3 - Enterotoxinas Estafilocócicas Produzidas por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados

Um dos objetivos do trabalho foi detectar a presença de cepas produtoras de enterotoxinas estafilocócicas em baixas concentrações, impossíveis de serem detectadas pelo método de Ouchterlony, cuja sensibilidade está ao redor de 500 ng/mL de sobrenadante. Portanto, todos os sobrenadantes foram submetidos

ao processo de liofilização, obtendo-se uma concentração 10 vezes maior que a inicial e reensaiados.

Assim, pode-se verificar que ainda foram encontradas 109 ou 19% de cepas enterotoxigênicas (tabela 03). Uma alta porcentagem de EED, 68,8% foi novamente observada, 12,8% das cepas foram produtoras de EEA, 7,3% de EEB e 2,8% de EEC. Dois tipos de enterotoxinas foram produzidas por algumas cepas, 3,7% produziram EEA - EEB e 4,6% produziram EEB - EED.

Tabela 03 - Tipos de Enterotoxinas Estafilocócicas Produzidas por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados.

Nº DE ISOLADOS TESTADOS	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS %	TIPOS DE ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS %						
		A	B	C	D	A-B	A-D	B-D
574	19,0	12,8	7,3	2,8	68,8	3,7	nd*	4,6

*nd - não detectada

Também foi observado que algumas cepas produziram mais de um tipo de enterotoxina em proporções diferentes, isto é, em uma mesma cepa verificou-se a produção de um tipo de enterotoxina antes da concentração do sobrenadante, e de um outro tipo após a concentração.

O número encontrado foi pequeno em relação ao total dos isolados. Observando-se que 12 cepas produziram EED e 1 produziu EEA numa concentração em torno de 500 ng/mL de sobrenadante e, destas 6 produziram EEA, 5 EEC e 2 EEB na concentração aproximada de 50 ng/mL de sobrenadante.

IV. 5 - Produção da Enzima Hemolisina por Cepas Enterotoxigênicas

Pela tabela 04 pode ser observado que dos 393 isolados positivos aos testes de coagulase e TNase, 337 mostraram-se enterotoxigênicos, e destes, 240 produziram hemolisina.

Tabela 04 - Incidência de Cepas Enterotoxigênicas Coagulase e Tnase Positivas e Produtoras ou não de Hemolisina.

Nº DE ISOLADOS COAGULASE(+) TNASE(+)	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS		CEPAS PRODUTORAS DE HEMOLISINA		CEPAS NÃO PRODUTORAS DE HEMOLISINA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
393	337	85,7	240	1,2	97	28,8

Na tabela 05 são apresentados os resultados referentes aos isolados coagulase negativos e Tnase positivos. Foram testadas 165 culturas e 73 destas produziram enterotoxinas. Das cepas enterotoxigênicas, apenas 33 produziram hemolisina.

Tabela 05 - Incidência de Cepas Enterotoxigênicas Coagulase Negativas e Tnase Positivas e Produtoras ou Não de Hemolisina.

Nº DE ISOLADOS COAGULASE(+) TNASE(+)	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS		CEPAS PRODUTORAS DE HEMOLISINA		CEPAS NÃO PRODUTORAS DE HEMOLISINA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
165	73	44,2	33	45,2	40	54,8

Isolou-se também, um pequeno número de cepas que apresentaram-se positivas ao teste de coagulase e negativas ao de TNase e, algumas que foram negativas a ambos os testes. Dos 4 isolados coagulase positivos e Tnase negativos testados, todos produziram enterotoxinas. A enzima hemolisina foi produzida por 2 das cepas enterotoxigênicas (tabela 06).

Na tabela 07 observa-se que dos 12 isolados coagulase e TNase negativos, 9 foram enterotoxigênicos. Destes, 2 foram hemolisina positivos.

Tabela 06 - Incidência de Cepas Enterotoxigênicas Coagulase Positivas e TNase Negativas e Produtoras ou Não de Hemolisina.

Nº DE ISOLADOS COAGULASE(+) TNASE(+)	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS		CEPAS PRODUTORAS DE HEMOLISINA		CEPAS NÃO PRODUTORAS DE HEMOLISINA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
4	4	100	2	50	2	50

Tabela 07 - Incidência de Cepas Enterotoxigênicas Coagulase e TNase Negativas e Produtoras ou Não de Hemolisinas.

Nº DE ISOLADOS COAGULASE(+) TNASE(+)	CEPAS ENTEROTOXIGÊNICAS		CEPAS PRODUTORAS DE HEMOLISINA		CEPAS NÃO PRODUTORAS DE HEMOLISINA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
12	9	75	2	22,2	7	77,8

IV. 6 - Relação Entre Estafilococos Enterotoxigênicos e Não Enterotoxigênicos Isolados de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes não Concentrados.

Na tabela 08 são apresentadas as porcentagens de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas isoladas das amostras de leite, antes dos sobrenadantes de cultura terem sido concentrados.

Através da análise estatística podemos inferir que houve diferentes respostas entre as amostras dos produtores (P).

Para as amostras de leite P2, P6 e o Pool, a taxa de cepas enterotoxigênicas foi significativamente maior que a taxa das cepas não enterotoxigênicas. As amostras do P5 e P10 apresentaram proporções significativamente inferiores de cepas enterotoxigênicas. Para as amostras do P3, P4, P7, P8 e P9 houve semelhança entre as taxas de estafilococos enterotoxigênicos e não enterotoxigênicos.

Ainda nesta tabela, comparando-se as amostras de cada produtor, fixando-se uma resposta, isto é, cepas enterotoxigênicas ou não, pode-se deduzir que:

-Os estafilococos enterotoxigênicos encontrados nas amostras do Pool e do P2 foram significativamente superiores aos encontrados nas amostras do P5 e P10.

-Quanto as demais comparações, não foram significativas.

Tabela 08 - Proporções de Estafilococos Enterotoxigênicos e Não Enterotoxigênicos Isolados de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Não Concentrados.

PRODUTOR	CEPAS		Nº TOTAL DE CULTURAS TESTADAS
	I	II	
Pool	0,682 b B	0,318 a A	66
P2	0,655 b B	0,345 a A	87
P3	0,444 ab A	0,556 ab A	45
P4	0,578 ab A	0,422 ab A	64
P5	0,393 a A	0,607 b B	61
P6	0,611 ab B	0,389 ab A	54
P7	0,574 ab A	0,426 ab A	47
P8	0,479 ab A	0,52 ab A	48
P9	0,590 ab A	0,410 ab A	39
P10	0,397 a A	0,603 b B	63

I - ENTEROTOXIGÊNICAS

II - NÃO ENTEROTOXIGÊNICAS

IV. 7 - Relação Entre Estafilococos Enterotoxigênicos e Não Enterotoxigênicos Isolados de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados.

As taxas de estafilococos enterotoxigênicos e não enterotoxigênicos isolados de leite em sobrenadantes de cultura concentrados estão inseridos na tabela 09.

Comparando-se as respostas das colunas I e II, podemos verificar que nas amostras de leite de todos os produtores as proporções de estafilococos não enterotoxigênicos foram significativamente superiores aos enterotoxigênicos.

Dando continuidade a análise, pode-se ainda inferir que entre as amostras dos produtores, fixando-se o tipo de cepa, têm-se o seguinte:

-As taxas de cepas enterotoxigênicas isoladas das amostras P5 foram significativamente inferiores às isoladas nas amostras P2, P6, P7, e P10. Para as amostras P10 as cepas enterotoxigênicas foram significativamente superiores às encontradas nas amostras P3, P4, P5, P8 e Pool.

Analisando as amostras de cada produtor em relação as cepas não enterotoxigênicas, verificamos que:

-As proporções encontradas nas amostras do Pool, P3, P4, P5 e P8 foram significativamente superiores à encontrada nas amostras do P10. Enquanto que a encontrada nas amostras do P5 foi significativamente superior às encontradas nas amostras P2, P6, P7 e P10.

As demais comparações entre as amostras dos produtores não diferiram entre si estatisticamente.

Tabela 09 - Proporções de *Estafilococos* Enterotoxigênicos e Não Enterotoxigênicos Isolados de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados.

PRODUTOR	CEPAS		Nº TOTAL DE CULTURAS TESTADAS
	I	II	
Pool	0,152 ab A	0,848 bc B	66
P2	0,184 bc A	0,816 ab B	87
P3	0,111 ab A	0,889 bc B	45
P4	0,156 ab A	0,884 bc B	64
P5	0,33 a A	0,967 c B	61
P6	0,241 bc A	0,759 ab B	54
P7	0,298 bc A	0,702 ab B	47
P8	0,146 ab A	0,854 bc B	48
P9	0,179 abc A	0,821 abc B	39
P10	0,397 c A	0,603 a B	63

I - ENTEROTOXIGÊNICAS

II - NÃO ENTEROTOXIGÊNICAS

IV. 8 - Relação Entre a Produção de Enterotoxinas, Coagulase e Termonuclease por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Não Concentrados.

A relação de estafilococos produtores de enterotoxinas e produtores ou não das enzimas coagulase e TNase foi investigada.

Os dados obtidos estão incluídos na tabela 10. Pode-se observar que foram isoladas cepas enterotoxigênicas que apresentaram respostas diferentes quanto a produção de coagulase e TNase.

Os resultados das amostras de leite de cada produtor foram analisados em relação às diferentes respostas encontradas, isto é, produção de TNase e coagulase, não produção de TNase e coagulase, produção de TNase e não produção de coagulase e não produção de TNase e produção de coagulase. Também foi feita uma correlação entre os resultados das amostras dos produtores para cada resposta estudada.

Analisando os resultados obtidos das amostras de cada produtor, dentro das respostas encontradas pode-se dizer que:

-As proporções de estafilococos TNase (+) e coagulase (+) isolados das amostras Pool, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9 e P10 foram significativamente maiores que os isolados TNase (-) e coagulase (-), TNase (+) e coagulase(-), TNase (-) e coagulase(+) e, estas não diferiram entre si.

-Para as amostras de leite P8, os isolados Tnase (+) e coagulase (+) também foram significativamente superiores aos isolados que apresentaram as outras respostas, enquanto que as taxas de cepas Tnase (+) e coagulase (-) foram significativamente superiores às taxas de Tnase (-) e coagulase (-) e Tnase (-) e coagulase (+), sendo as duas últimas respostas semelhantes.

Não houve diferença significativa entre as amostras dos produtores para cada resposta estudada.

Tabela 10 - Proporções da Produção de Enterotoxinas, Coagulase e Termoonuclease por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes não Concentrados.

PRODUTOR	PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS %				Nº DE CULTURAS TESTADAS
	TNASE (+) COAGULASE(+)	TNASE(-) COAGULASE(-)	TNASE(+) COAGULASE(-)	TNASE(-) COAGULASE(+)	
Pool	0,800 a B	0,044 a A	0,133 a A	0,022 a A	45
P2	0,895 a B	0,000 a A	0,053 a A	0,053 a A	57
P3	0,850 a B	0,000 a A	0,150 a A	0,000 a A	20
P4	0,919 a B	0,027 a A	0,054 a A	0,000 a A	37
P5	0,875 a B	0,000 a A	0,125 a A	0,000 a A	24
P6	0,848 a B	0,000 a A	0,152 a A	0,000 a A	33
P7	0,889 a B	0,000 a A	0,111 a A	0,000 a A	27
P8	0,696 a C	0,043 a A	0,261 a B	0,000 a A	23
P9	0,783 a B	0,000 a A	0,217 a A	0,000 a A	23
P10	0,800 a B	0,000 a A	0,200 a A	0,000 a A	25

IV. 9 - Relação Entre a Produção de Enterotoxinas, Coagulase e Termonuclease por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados.

Os estafilococos enterotoxigênicos baixo produtores de enterotoxinas continuaram apresentando os mesmos tipos de respostas quanto a produção ou não das enzimas TNase e coagulase.

Na tabela 11 são apresentadas as proporções da produção de enterotoxinas, coagulase e TNase encontradas nas amostras de leite.

Comparando-se os resultados das amostras obtidas de cada produtor dentro das respostas estudadas, pode-se inferir que:

-Para as amostras do Pool e P8 as taxas de estafilococos enterotoxigênicos TNase (+) e coagulase(+), TNase (-) e coagulase (-), TNase (+) e coagulase (-) e TNase (-) e coagulase (+) isoladas foram semelhantes.

-Para as amostras do P3, a proporção de cepas enterotoxigênicas isoladas que apresentaram a resposta TNase (+) e coagulase (-) foi significativamente maior das demais que não diferiram entre si.

-Para o P2, P4, P5, P9 e P10 as taxas de isolados TNase (+) e coagulase (+) foram significativamente superiores aos isolados que apresentaram as outras respostas, que não diferiram entre si.

-Nas amostras P6 e P7 as taxas de cepas TNase (+) e coagulase(+) e TNase (+) e coagulase (-) foram semelhantes, mas superiores às taxas de cepas TNase (-) e coagulase (-) e TNase (-) e coagulase (+) e, estas não diferiram entre si.

Continuando a análise e fazendo-se uma comparação dos resultados obtidos entre as amostras de cada produtor, fixando-se uma resposta, podemos deduzir que:

As amostras do Pool e P3 apresentaram proporções de cepas TNase (+) e coagulase (+) significativamente inferiores às encontradas nas amostras P2, P4, P5, P9 e P10, e às encontradas nos P6, P7 e P8 inferiores às do P4 e P5.

-Em relação as cepas TNase (+) e coagulase (-), as taxas encontradas nas amostras P2, P4, P5 e P10 foram significativamente inferiores ao encontrado nas amostras P3, P6 e P7.

Demais comparações entre as amostras dos produtores não foram estatisticamente significativas.

Tabela 11 - Proporções da Produção de Enterotoxinas, Coagulase e Termonuclease por Cepas Isoladas de Leite Cru de Bovino, em Sobrenadantes Concentrados.

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS %					
PRODUTOR	TNASE (+) COAGULASE(+)	TNASE(-) COAGULASE(-)	TNASE(+) COAGULASE(-)	TNASE(-) COAGULASE(+)	Nº DE CULTURAS TESTADAS
Pool	0,200 a A	0,300 a A	0,400 ab A	0,100 a A	10
P2	0,875 bc B	0,000 a A	0,125 a A	0,000 a A	16
P3	0,200 a A	0,000 a A	0,800 b B	0,000 a A	5
P4	1,000 c B	0,000 a A	0,000 a A	0,000 a A	10
P5	1,000 c B	0,000 a A	0,000 a A	0,000 a A	2
P6	0,385 ab B	0,000 a A	0,615 b B	0,000 a A	13
P7	0,357 ab B	0,000 a A	0,643 b B	0,000 a A	14
P8	0,429ab A	0,286 a A	0,286 ab A	0,000 a A	7
P9	0,857bc B	0,000 a A	0,143 ab A	0,000 a A	7
P10	0,920 bc B	0,000 a A	0,080 a A	0,000 a A	25

V - DISCUSSÃO

Um dos objetivos desta pesquisa foi avaliar o nível de contaminação de leite por *Staphylococcus sp* antes da pasteurização. Os resultados comprovam a presença de estafilococos em leite cru de bovino em níveis que variam de 10^3 a 10^5 UFC/mL.

SANTOS et al. (1981) constataram a incidência de *Staphylococcus aureus* em 46,9% das amostras de leite cru utilizado para a produção de queijo tipo "Minas". No presente trabalho foram analisadas 140 amostras de leite provenientes de 9 produtores e um pool de todo o leite recebido no dia da coleta, e em todas as amostras foi verificada a presença de estafilococos.

Uma população de 10^6 ou mais células de estafilococos enterotoxigênicos por grama de alimento é geralmente considerada suficiente para a produção de quantidades de enterotoxinas suficientes para vir a causar intoxicação, caso o alimento seja consumido (NEWSOME, 1988). Apesar de, neste trabalho, encontrarem-se populações entre 10^3 a 10^5 UFC/mL de leite, o crescimento de estafilococos pode atingir níveis onde a enterotoxina seja produzida. Isto pode ser comprovado através dos relatos feitos por DELAZARI et al. (1978) que inocularam *Staphylococcus aureus* em níveis de 10^3 a 10^5 microrganismos por grama de leite, para a fabricação de queijo tipo "Minas", verificando o desenvolvimento dessa bactéria em números suficientes para produzir enterotoxina e causar intoxicação.

Alguns dos isolados testados apresentaram reação negativa ao teste de catalase e foram produtores de EED. Isto não é comum no gênero *Staphylococcus*, uma vez que são catalase positivos. TU and PALUTKE (1976) isolaram e caracterizaram linhagens de *Staphylococcus aureus* catalase negativas obtidas de amostras de sangue de 5 pacientes com septicemia. Estes autores observaram ainda, a capacidade de não fermentação de manitol e concluíram que as bactérias embora catalase negativas, continham um sistema citocromo, observado

pelo teste de benzidina. Vários testes bioquímicos foram realizados e mostraram que exceto pelos resultados de catalase e fermentação de manitol, todas as outras reações foram típicas de *Staphylococcus aureus*. Como o objetivo deste trabalho não foi detectar cepas catalase negativas, estas não foram melhor estudadas. Para o momento, torna-se importante a sua divulgação, e posteriormente, novos estudos deverão ser realizados com estas cepas.

Com a finalidade de identificação das cepas de *Staphylococcus aureus* foram realizadas as provas de coagulase e TNase, como descritas no American Public Health Association - APHA (1984). Encontrou-se cepas positivas e negativas a estes testes. Como não podemos afirmar com segurança que as cepas TNase e coagulase positivas eram realmente de *Staphylococcus aureus*, pois outras espécies também são positivas a estes testes, como por exemplo, *Staphylococcus intermedius*, foi realizada a prova de produção de hemolisina. O *Staphylococcus aureus* é positivo ao teste, mas, como pode ser observado na tabela 04, 28,8% das culturas testadas não produziram esta enzima. Para as outras culturas testadas, algumas foram produtoras e outras não, como pode ser verificado nas tabelas 05, 06 e 07. De acordo com SCHLEIFER (1986) pode-se sugerir que as cepas positivas aos testes de coagulase, termonuclease e hemolisina sejam de *Staphylococcus aureus*.

Para que não houvesse dúvida quanto ao gênero a que pertencem as cepas negativas ao teste de TNase ou coagulase foi realizada a prova de fermentação de manitol em anaerobiose, e todas as culturas foram positivas ao teste, diferenciando-as do gênero *Micrococcus*, que é estritamente aeróbio (SCHLEIFER, 1986).

Assim, os isolados foram testados para a produção de enterotoxinas.

Conforme mostra a tabela 02, das 574 culturas testadas para a produção de enterotoxinas, 54,7% foram positivas. A porcentagem de linhagens enterotoxigênicas é alta, comparada aos valores obtidos por NARDER et al. (1988), FURLANETTO et al. (1987), SCHOCKEN-ITURRINO et al. (1986) e LOPES et al. (1990) que obtiveram índices de 1,3%; 8,0%; 15,7% e 4,7%, respectivamente. Nossos resultados mostraram uma alta incidência de EED, diferentemente do observado nos trabalhos dos autores citados.

Quanto a produção de enterotoxinas, a forma predominante foi a EED, porém houve também a produção de EEA, EEB e EEC em menor proporção. A partir de leite de vacas mastíticas OLSON et al. (1970) observaram que de 157 culturas testadas, 23 produziram enterotoxinas e destas, 11 produziram EED, 11 produziram EEC e uma produziu EEC e EED. GARCIA et al. (1980) encontraram 7% de cepas enterotoxigênicas, sendo produtoras de enterotoxinas EEC e EED. ABBAR et al. (1986) verificaram que de 79 cepas, 5 produziram EEC e 2 produziram EED. Apesar do baixo nível de linhagens enterotoxigênicas encontradas, nos trabalhos citados, as enterotoxinas estafilocócicas D e C foram as formas predominantes.

Supondo que o leite analisado neste trabalho seja proveniente de vacas sadias, uma vez que é fornecido a uma cooperativa que irá distribuí-lo aos consumidores, surpreende-nos a alta porcentagem de estafilococos enterotoxigênicos encontrados.

A falta de um bom controle higiênico exercido nas fazendas pode ter sido uma das causas dessa contaminação. A contaminação pode ter ocorrido também, devido a falhas nos procedimentos de limpeza, coleta e transporte do produto. Um outro fator que deve ser levado em consideração são os manipuladores, durante e após a ordenha, já que os estafilococos podem ser encontrados nas mãos e fossas nasais de humanos. Também foi observado durante o período da realização deste trabalho, que o leite coletado nas fazendas permanecia várias horas nos latões onde eram transportados, em temperatura ambiente, até a chegada na Cooperativa, o que pode ter ocasionado a multiplicação dos microrganismos.

A legislação brasileira exige a pasteurização do leite usado para o processamento de seus derivados, mas dependendo do tempo decorrido até a pasteurização, a população de estafilococos pode desenvolver-se em número suficiente para a produção de enterotoxinas. Sabendo-se de sua termorresistência, mesmo após o processamento térmico, as enterotoxinas podem ainda estar ativas. Além do que, muitas vezes queijos artesanais frequentemente são comercializados sem a pasteurização prévia do leite utilizado para a sua produção, podendo assim, vir a causar surtos de intoxicação estafilocócica como os relatados por SABIONI et al. (1988), CARMO et al. (1990) e PEREIRA et al. (1990).

São raros os trabalhos que tratam da existência e importância de linhagens baixo produtoras de enterotoxinas (KOKAN and BERGDOLL, 1987; PEREIRA and SALZBERG, 1990). EVENSON et al. (1988) estudando um surto ocorrido nos EUA, verificaram que uma dose de 100 a 200 ng de enterotoxina A por indivíduo são suficientes para causar intoxicação estafilocócica. Torna-se então muito importante a detecção de tais cepas nos alimentos susceptíveis ao seu crescimento.

A metodologia geralmente utilizada na detecção de enterotoxinas é o método de imunodifusão de Ouchterlony, a mesma utilizada neste trabalho, sendo a sensibilidade do método de 500 ng/mL de enterotoxinas, estando acima dos níveis que podem vir a causar intoxicações, como recomendações do APHA.

Somente com o aprimoramento de novas metodologias analíticas, como as técnicas de ELISA e Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA), foi possível evidenciar tais cepas, detectando-se as enterotoxinas diretamente nos alimentos. Mas, infelizmente, essas técnicas nem sempre são disponíveis a qualquer laboratório, uma vez que, são ainda pouco difundidas e requerem uma infraestrutura adequada, tanto a nível de reagentes e equipamentos, quanto a pessoal técnico treinado.

Portanto, para detectar-se cepas baixo produtoras de enterotoxinas foi necessária a concentração dos sobrenadantes de cultura, aumentando-se assim, a sensibilidade da técnica de Ouchterlony em 10 vezes.

A concentração dos sobrenadantes permitiu a detecção de mais 19% de cepas de estafilococos enterotoxigênicos produtores das enterotoxinas dos tipos A, B, C e D, sendo que as do tipo C só foram diagnosticadas após os procedimentos de concentração (tabela 03). Observou-se também, após a concentração dos sobrenadantes, que uma mesma cepa produziu um outro tipo de enterotoxina não detectado antes, devido à produção em baixos níveis.

Tais cepas seriam consideradas não produtoras de enterotoxinas pela metodologia convencional, isto é, sem a concentração dos sobrenadantes de cultura. As quantidades de toxinas detectadas apresentaram níveis suficientes para virem a provocar episódios de intoxicação alimentar.

Os dados obtidos neste trabalho foram submetidos à análise estatística, sendo avaliados com maior critério.

As tabelas 08 e 09 mostram as porcentagens obtidas de estafilococos enterotoxigênicos e não enterotoxigênicos, antes e após a concentração dos sobrenadantes da cultura.

As proporções de cepas enterotoxigênicas encontradas na maioria das amostras de leite dos produtores foram significativamente superiores àquelas que não apresentaram tal característica. Ainda pelas tabelas 08 e 09, comparando-se as amostras de cada produtor entre si, para as proporções de cepas enterotoxigênicas, pode-se observar que em algumas amostras tal porcentagem foi significativamente inferior em relação às amostras de leite de outros produtores.

A diferença encontrada entre as amostras dos diferentes produtores, pode ser devido à existência de um melhor controle higiênico exercido em tais fazendas, ou ao acaso. Mas, mesmo havendo tal diferença, em todas as amostras foram encontrados estafilococos enterotoxigênicos. Esses dados vêm

comprovar o risco de uma intoxicação alimentar estafilocócica à população consumidora de leite cru.

A característica de enterotoxigenicidade mais amplamente utilizada é a reação de coagulase (TATINI, 1984), na identificação de linhagens de *Staphylococcus aureus*. A produção de termonuclease também é de grande importância para sua identificação, uma vez que é produzida por 99% dos estafilococos coagulase positivos (PARK et al., 1980). Porém, existem algumas linhagens toxigênicas que são coagulase negativas (GRAMOLI & WILKINSON, 1978).

Nas tabelas 10 e 11 estão demonstradas as porcentagens de cepas enterotoxigênicas que foram produtoras ou não das enzimas coagulase e TNase.

Na maioria das amostras os estafilococos enterotoxigênicos TNase e coagulase positivos foram significativamente superiores aos isolados que apresentaram respostas diferentes a estes testes. Sabendo-se da ubiquidade do *Staphylococcus aureus* na natureza, e por ser frequentemente encontrado no úbere de bovinos (MATOS et al., 1991) é de se esperar que a maioria dos estafilococos enterotoxigênicos fosse produtora das enzimas coagulase e TNase.

Contudo, nas amostras de leite dos produtores 3, 6 e 7 encontrou-se um número significativo de cepas baixo produtoras de enterotoxinas e coagulase negativas (tabela 11).

WHITE et al. (1989) descreveram várias espécies coagulase negativas isoladas em diferentes locais do corpo de fêmeas da espécie bovina. As espécies de estafilococos mais frequentes foram o *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus warneri*. As outras espécies isoladas foram: *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus sp.*

Em 1969 foi relatado um surto de gastroenterite devido à ingestão de enterotoxinas estafilocócicas presentes nos alimentos produzidas por *Staphylococcus epidermides* (Breckinridge and Bergdoll, 1971).

Comumente, o controle feito pelas indústrias alimentícias e órgãos responsáveis pela fiscalização sanitária utilizam a metodologia recomendada pelo FDA (Food and Drug Administration) (1984) e APHA (1984), adotando a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, coagulase positivos, apenas.

Diante do exposto, fica claro que espécies coagulase negativas podem ser encontradas e até mesmo provocarem surtos de intoxicação alimentar devido a capacidade de produção de enterotoxinas, e como normalmente as legislações não requerem ainda este tipo de análise, a exposição da população a este risco é ainda muito grande.

VI - CONCLUSÕES

O estudo da incidência de cepas de estafilococos enterotoxigênicos produtores e baixo produtores de enterotoxinas isoladas de leite bovino cru, permitiu obterem-se as seguintes conclusões:

- 01 - O trabalho mostrou que a metodologia preconizada como rotina em análise de estafilococos é deficiente quando verificou-se que cepas catalase negativas mostraram-se toxigênicas, e pelos procedimentos usuais, tais microrganismos seriam descartados em análises preliminares.
- 02 - A presença de cepas baixo produtoras de enterotoxinas apresentou índices elevados, não sendo possível sua detecção por técnicas convencionais de enterotoxinas, devido à baixa sensibilidade destas metodologias.
- 03 - O trabalho possibilitou demonstrar uma alta incidência de cepas produtoras de algum tipo de enterotoxina. Pelas condições de recebimento do leite na cooperativa, é pertinente concluir que existem grandes possibilidades de ocorrer a produção destas toxinas no leite cru, embora, a detecção direta de enterotoxinas no produto não tenha sido realizada. Sendo as enterotoxinas resistentes à temperatura utilizada na pasteurização, podem ainda permanecer ativas e desencadear surtos de intoxicação, quando este alimento for consumido.
- 04 - A presença de cepas que apresentaram a capacidade de produzir simultaneamente, mais de um tipo de enterotoxina foi significativa.

- 05 - A prevalência de enterotoxina D foi significativa em relação às outras enterotoxinas, podendo-se concluir que esta toxina está relacionada à maioria de surtos de intoxicação alimentar veiculadas através de leite.
- 06 - As metodologias propostas mencionam sempre *S. aureus* coagulase positivos como potencialmente enterotoxigênicos. A análise estatística demonstrou que em algumas amostras, as porcentagens de cepas enterotoxigênicas coagulase negativas foram superiores às coagulase positivas. Tais cepas são de grande importância, podendo vir a causar intoxicação alimentar, já que normalmente não são testadas quanto a produção de enterotoxinas.
- 07 - De acordo com os estudos estatísticos, concluiu-se que a taxa de incidência de cepas enterotoxigênicas encontradas nas amostras variou entre os diferentes produtores. Sendo alta a porcentagem encontrada entre todos os produtores.
- 08 - Podemos concluir que há necessidade de uma revisão da metodologia convencional para a detecção de *S. aureus* em alimentos, visto que muitas das características bioquímicas das cepas enterotoxigênicas neste trabalho diferiram do esperado. A revisão de metodologia deve estender-se em relação a análise de enterotoxinas, devido à existência de inúmeras cepas baixo produtoras de enterotoxinas.
- 09 - Há a necessidade da adoção, em laboratórios de microbiologia de alimentos, de metodologias mais sensíveis para a identificação de cepas baixo produtoras de enterotoxinas, quer por procedimentos que permitam a concentração de extratos para serem analisados pelos métodos usuais, quer pela utilização de técnicas mais sensíveis, como os ensaios imunoenzimáticos ou aglutinação passiva reversa em latex.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ABBAR, F. M.; MOHAMMED, M. T. and ARSLAIN, S. H. Selected biological properties of enterotoxigenic staphylococci isolated from milk. **J. Food Protection** **49** (11): 871 - 873, 1986.
- 02 - ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R. and HOOVER, D. G. Production of enterotoxin (s) by *Staphylococcus hyicus*. **Vet. Microbiol.** **9**: 487 - 495, 1984.
- 03 - APHA - American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Speck, M. L. (ed.); 2ª ed., Washington, D. C., 1984.
- 04 - BAIRD-PARKER, A. C.. The staphylococci: An introduction. **J. Appl. Bacteriol. symposium supplement**, 15 - 85, 1990.
- 05 - BARBER, L.E. and DEIBEL, R. H. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. **Appl. Microbiol.** **24**: 891 - 898, 1972.
- 06 - BEERY, J. T.; TAYLOR, S. L.; SCHLUNZ, L. R. et. al.. Effects of staphylococcal enterotoxin A on the rat gastrointestinal tract. **Infect. Immun.** **44**: 234 - 240, 1984.

- 07 - BENNETT, R. W.; YETERION, M., SMITH, W. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. **J. Food Sci.** **51**: 1337 - 1339, 1986.
- 08 - BERGDOLL, M. S.. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.** **10**: 91 - 100, 1990.
- 09 - BERGDOLL, M. S.. Enterotoxins. In: C. F. S. Easman and C. Adlam (ed), **Staphylococci and Staphylococcal Infections**, v. 2, Academic Press, Inc. (London). Ltd. London, 1983. p. 559 - 598.
- 10 - _____ Staphylococcal Intoxications. In: Rieman, H and Bryan, F. L. **Food Borne Infections and Intoxications**. Academic Press, New York, 1979. p. 443 - 494.
- 11 - _____ The enterotoxins. In: Cohen, J. O. (ed). **The Staphylococci**. , Wiley - Interscience, Toronto, 1972. p. 301- 331.
- 12 - BRECKINRIDGE, L. C. and BERGDOLL, M. S.. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. **Med. Intelligence** **284** (10): 541 - 543, 1971.
- 13 - BRUNNER, K. G. and WONG, A. C.. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in mushrooms. **J. Food Sci.** **57** (3): 700 - 703, 1992.

- 14 - BRYANT, R.; JARVIS, J. and GUIBERT, G.. Selective enterotoxin production by a *Staphylococcus aureus* strain implicated in a foodborne outbreak. **J. Food Protec.** **51** (2): 130 - 131, 1988.
- 15 - CARMO, L. S. and BERGDOLL, M. S.. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Rev. Microbiol.** **21** (4): 320 - 323, 1990.
- 16 - CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.. The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. **Health Lab. Sci.** **6**: 185 - 197, 1969.
- 17 - CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J. Bacteriol.** **94**: 1875 - 1882, 1967.
- 18 - CASMAN, E. P.; BENNETT, W. Detection of Staphylococcal enterotoxin in food. **Appl. Microbiol.** **13**: 181 - 189, 1965.
- 19 - CASMAN, E. P. BERGDOL, M. S. & ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxins. **J. Bacteriol.** **85**: 715 - 716, 1963.
- 20 - CORRÊA, U. M. & CORRÊA, C. N. M.. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.** J. M. Varela (ed), São Paulo, 1979. 832 p..
- 21 - CRASS, B. A. and BERGDOLL, M. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **J. Clin. Microbiol.** **23**: 43 - 45, 1986.

- 22 - DANIELSON, M. L. and HELLBERG, B.. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. **Acta Vet. Scand.** **18**: 266 - 273, 1977.
- 23- DEBRIESE, L. A.. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. **J. Appl. Bacteriol.** **49**: 1 - 11, 1980.
- 24 - DE BUYSER, M. L.; DILASSER, F.; HUMMEL, R. & BERGDOLL, M. S.. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. **Inter. J. Food. Microbiol.** **5**: 301 - 309, 1987.
- 25 - DELAZARI, I.; LEITÃO, M. F.F.; GERALDINI, A. M. et al.. Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxina em queijo tipo "Minas". **Colet. Instit. Tecnol. Alimentos** **9**: 163 - 174, 1978.
- 26 - DONNELLY, C. B.; LESLIE, J. E. and BLACK, L.A. Production of enterotoxin A in milk. **Appl. Microbiol.** **16**: 917 - 924, 1968.
- 27 - EL-DAIROUTY, K. R.. Staphylococcal intoxication traced to non-fat dried milk. **J. Food Protec.** **52**: 901 - 902, 1989.
- 28 - EVANS, J. B. and NIVEN Jr, C. F.. Comparative studies of known food poisoning staphylococci and related varieties. **J. Bacteriol.** **59**: 545 - 550, 1950.

- 29 - EVANS, J. B; BEUTTNER, L.G. and NIVEN Jr., C. F.. Evaluation of coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. **J. Bacteriol.** 60: 481 - 484, 1950.
- 30 - EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S. and BERGDOLL, M. S.. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Int. J. Food Microbiol.** 7: 311 - 316, 1988.
- 31 - FDA - Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual.** Arq. Fac. Engenharia de Alimentos, UNICAMP, v. 6, p. 77 - 88, 1984.
- 32 - FEY, H.; PFISTER, H. and RÜEGG, O.. Comparative Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. **J. Clin. Microbiol.** 19: 34 - 38, 1984.
- 33 - FREED, R. C.; EVENSON, M. L.; REISER, R. F. and BERGDOLL, M. S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 1349 - 1355, 1982.
- 34 - FREITAS, M. A. Q. e MAGALHÃES, H.. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. **Rev. Microbiol.** 21 (4): 315 - 319, 1990.

- 35 - FRENEY, J.; BRUN, Y.; BES, M.; MEUGNIER, H.; GRINIONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; NERVI, C. & FLEURETT, J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov.. Two species from human clinical specimens. **Internat. J. Systematic Bacteriol.** **38**: 168 - 172, 1988.
- 36 - FUKUDA, S.; TOKUNA, H.; OGAWA, H.; SASAKI, M.; KISHIMOTO, T.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A. and KIMURA, S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. **Zbl. Bakteriolog. Hyg.** **258**: 360 - 367, 1984.
- 37 - FUJIKAWA, H. & IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. **Appl. and Environ. Microbiol.** **54**: 2345 - 2348, 1988.
- 38 - FUNG, D. Y.C.; STEINBER, D. H.; MILLER, R. D.; KURANTNICK, M. J. & MURPHY, T. F. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C. **Appl. Microbiol.** **26**: 938 - 942, 1973.
- 39 - FURLANETTO, S. M.P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D. & SCHOCKEN-ITURRINO, R. R.. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. **Rev. Microbiol.** **18** (2): 138 - 143, 1987.
- 40 - GARCIA, M. C.; OTERO, A.; GARCIA, M.L.; GARCIA, M. R. & MORENO, B. Species identification of staphylococci and micrococci isolated from ewes' milk cheeses. **J. Dairy Research** **55**: 269 - 276, 1988.

- 41 - GARCIA, M. L.; MORENO, B. and BERGDOLL, M.S.. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Appl. and Environ. Microbiol.** **39**(3): 548 - 553, 1980.
- 42 - GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals Mathemat. Stat.** **35** (2): 716 - 725, 1964.
- 43 - _____ Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial proportions. **Technometrics** **7** (2): 247 - 254, 1965.
- 44 - GRAMOLI, J. L. & WILKINSON, B. J.. Characterization and identification of coagulase- negative, heat- stable desoxyribonuclease positive staphylococci. **J. of General Microbiol.** **105**: 275 - 285. 1978.
- 45 - GUITIERREZ, L. M.; MENES, I.; GARCIA, M. C.; MORENO, B. & BERGDOLL, M. S. Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. **J. Food Protec.** **45**: 1282 - 1286, 1982.
- 46 - GILMOUR, A & HARVEY, J.. Staphylococci in milk and milk products. **J. Appl. Bacteriol.- simposium supplement**, 147 S - 166S, 1990.
- 47 - GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Int. J. Food. Microbiol.** **9**: 327 - 360, 1989.

- 48 - GOEPFER, J. M. and KIM, H. U. Behavior of selected food borne pathogens in raw ground beef. **J. Milk Food Technol.** **38**: 449 - 452, 1975.
- 49 - HARDT-ENGLISH, P.; YORK, G.; STIER, R. and COCOTAS, P. Staphylococcal food poisoning outbreaks caused by canned mushrooms from China. **Food Technol.** 74 - 78, 1990.
- 50 - HARVEY, J. & GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Appl. Microbiol.** **7**: 79 - 82, 1988.
- 51 - HARVEY, J. & GILMOUR, A.. Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. **J. Appl. Bacteriol.** **59**: 207 - 221, 1985.
- 52 - IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M.; CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Rev. Saúde Públ.**, **14**: 93 - 100, 1980.
- 53 - JOHNSON, H. M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMAN, P. E. and PEELER, J. T. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. **Appl. Microbiol.** **22**: 837 - 841, 1971.
- 54 - KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Ann. Rev. Microbiol.** **34**: 559 - 592, 1980.

- 55 - KOKAN, N. P. & BERGDOLL, M. S.. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** **53**: 2675 - 2676, 1987.
- 56 - LEE, A. C. M.; ROBBINS, R. N.; REISER, R. F. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C and C₂. **Infect and Immunity** **27**: 431 - 434, 1980.
- 57 - LOMBAI, G. Y. Study of the correlation between the thermostable desoxyribonuclease (TNase) and toxin production in *Staphylococcus aureus*. **Acta Alimentaria** **14**: 84 - 88, 1985.
- 58 - LOPES, C. A. M.; MORENO, G.; CURI, P. R.; GOTTSCHALK, A. F.; MODOLO, J.R.; HORACIO, A.; CORRÊA, A. and PAVAN, C. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Br. Vet. J.** **146** : 443 - 447, 1990.
- 59 - LOTTER, L. P. and GENIGEORGIS, C.. Desoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. **Appl. Microbiol.** **39**: 152 - 158, 1975.
- 60 - MARIN, M. E.; LA ROSA, M. C. and CORNEJO, I.. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. **Appl. and Environ. Microbiol.** **58** (3): 1067 - 1069, 1992.
- 61 - MARRACK, P. and KAPPLER, J.. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science** **248**: 705 - 711, 1990.

- 62 - MATOS, J. S.; WHITE, D. G.; HARMON, R.J. and LANGLOIS, B. E.
Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating
mammary gland. **J. Dairy Sci.** **74**: 1544 - 1549, 1991.
- 63 - MEYER, R. E. & PALMIERI, M. J.. Single radial immunodiffusion method
for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. **Appl. and
Environ. Microbiol.** **40**: 1080 - 1085, 1980.
- 64 - Mc LEAN, R. A.; LILLY, H. D.. and ALFORD, J. A.. Effects of meat - curing
salts and temperature on production of *Staphylococcus* enterotoxin B. **J.
Bacteriol.** **95**: 1207 - 1211, 1968.
- 65 - MINOR, I. E. & MARTH, E. H.. Staphylococcal food poisoning. A review.
Characteristics and isolation of staphylococci properties of enterotoxins
and epidemiology of staphylococcal intoxications. **The Ind. J. Nutr.
Dietet.** **9**: 161 - 186, 1972.
- 66 - MORITA, T. N.; PATTERSON, J. E. and WOODBURN, M. J.. Magnesium
and iron addition to casein hydrolysate medium for production of
staphylococcal enterotoxins A, B and C. **Appl. Environ. Microbiol.** **38**:
39 - 42, 1979.
- 67 - MORITA, T. N. & WOODBURN, M. J.. Homogeneous enzyme immune
assay for staphylococcal enterotoxin B. **Infect. Immunity** **21**: 666 -
668, 1978.

- 68 - NANU, E. and NARAYAN, K. G.. Enterotoxin production by staphylococci isolated from pork kalab, salami and other sources by Elisa. **J. Food Sci. Tecnol.** **29** (4): 383 - 384, 1992.
- 69 - NARDER, F. A.; ROSSI Jr., O. D. & SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. **Rev. Microbiol.** **19** (4): 369 - 373, 1988.
- 70 - NEWSOME, L.. *Staphylococcus aureus*. **Food Technol.** **42**: 194 - 195, 1988.
- 71 - NISKANEN, A. and KOIRANEM, L.. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. **J. Food Protection** **40** (8): 543 - 548, 1977.
- 72 - NG, D. L.K. and TAY, L.. Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eat foods. **Food Microbiol.** **10**: 317 - 320, 1993.
- 73 - OLSON, J. C.; CASMAN, E. P.; BAER, E. F. and STONE, J. E.. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. **Appl. Microbiol.** **20** (4): 605 - 607, 1970.
- 74 - OLSVIK, O.; FOSSUM, K. and BERDAL, B. Staphylococcal enterotoxin A, B and C produced by coagulase-negative strains within the family of *Micrococcaceae*. **Acta. Path. Microb. Scand. sect. B** **90**: 441 - 444, 1982.

- 75 - OLSVIK, O.; BERDAL, B. P.; FOSSUM, K. & OMLAND, T.. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. **Acta Path. Microb. Scand. section B** 89: 423 - 426, 1981.
- 76 - ORTH, D. S. Iodination of staphylococcal enterotoxin B by use of chloramine - T. **Appl. Environ. Microbiol.** 33: 824 - 828, 1977.
- 77 - OUCHTERLONY, O. Antigen antibody reactions in gels. **Acta Path. Microb. Scan.**, 32: 231 - 240, 1953.
- 78 - PARK, C. E.; MELO, A. S.; LANDGRAF, M.; HUANG, J.C.; STANKIEWICZ, Z & RAYMAN, M. K.. A survey of microorganisms for thermonuclease production. **Can. J. of Microbiol.** 26: 532 - 535, 1980.
- 79 - PEREIRA, J. L. & SALZBERG, S. P. C.. **Estudo do comportamento de linhagens de *Staphylococcus aureus* baixo produtoras de enterotoxina tipo D em meio de hidrolisado proteico, creme de confeitaria e presunto cozido.** Campinas, 1990, 123 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- 80 - PEREIRA, J. L. & SALZBERG, S. P.. Regulation of staphylococcal enterotoxins A and B produced by strain 5-6. **J. of Food Protection** 45: 1306 - 1309, 1982.

- 81 - PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S. & CARMO, L.S.. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo "Minas". **Rev. Microbiol.** **22** (4): 349 - 350, 1991.
- 82 - POLLEDO, J. J.; GARCIA, M. L.; MORENO, B. and MENES, I. Importance of foods handlers as a source of enterotoxigenic staphylococci. **Zbl. Bakteriol. Hyg.**, 364 - 373, 1985.
- 83 - RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F. e MENDONÇA, C. P.. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre manipuladores de alimentos. **Rev. Saúde Públ.** **22** (1): 36 - 40, 1988.
- 84 - READ, R. B. & BRADSHAW, J. G.. Irradiation of staphylococcal enterotoxin B. **Appl. Microbiol.** **15**: 603 - 605, 1967.
- 85 - ROBBINS, R.; GOULD, S. & BERGDOLL, M. S.. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strain. **Appl. Microbiol.** **28**: 946 - 950, 1974.
- 86 - SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. L. e SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo "Minas"contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde Públ.** **22** (5): 458 - 461, 1988.
- 87 - SAKARI, T. G. and ANOZIE, S. O.. Occurrence of enterotoxin producing strains of *Staphylococcus aureus* in meat and related samples from traditional markets in Nigeria. **J. Food Protection** **53**: 1069 - 1070, 1990.

- 88 - SANTOS, E. S.; GENIGEORGIS, C.; FARVER, T. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of brazilian Minas cheese. **J. of Food Protection** **44** (3): 172 - 176, 1981.
- 89 - SAUNDERS, G. C. and BARTLETT, M. L.. Double- antibody solid phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxina A. **Appl. Environ. Microbiol.** **34**: 518 - 522, 1977.
- 90 - SCHLEIFER, K. H. *Micrococcaceae*. In : Sneath, P. H. A., Mair, N. S.; Sharpe, M. E. and Holt, J. G (eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore, M. D, 1986. pp. 1003 - 1035.
- 91 - SCHOCKEN - ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A.; FURLANETO, S. M. P. & ROSSI JR., O. D. P.. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de vacas mastíticas. **Ars. Veterinaria** **2** (1): 69 - 79, 1986.
- 92 - SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R.; TATINI, S. R. & KRÄMER, J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. **Int. J. Food Microbiol.** **10**: 33 - 42, 1990.
- 93 - SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L. and PALUMBO, S. A.. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A Review. **J. of Food Protection** **46** (6): 545 - 555, 1983.

- 94 - SPERBER, W. H. The identification of staphylococci in clinical and food microbiology laboratories. **CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** 7: 121 - 184, 1976.
- 95 - SPERBER, W. H. and TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Appl. Microbiol.** 29: 502-505, 1975.
- 96 - STIFFLER - ROSEMBERG, G. and FEY, H. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B and C: Modification on enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.** 8: 473 - 479, 1978.
- 97 - SURGALA, M. J.; BERGDOLL, M. S. & DACK, G. M. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey - feeding test. **J. Laboratory and Clinica Medicine** 41: 782 - 788, 1953.
- 98 - TATINI, S. R.; HOOVER, G. D. and LACHICA, F.. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In : Speck, M. L. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Academic Press, New York, 1984. p. 411 - 429.
- 99 - TATINI, S. R. Thermal stability of enterotoxins in food. **J. Milk Technol.** 39: 432 - 438, 1976.
- 100 - _____ Influence of foods environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **J. Milk Food Technol.** 36 (11): 559 - 563, 1973.

- 101 - THATCHER, F. S. Recommended methods for microbiological examination. In: **Microorganisms in Foods**. Toronto Press, Toronto, 1968. p. 114 - 122.
- 102 - THATCHER, F. S. and GHODES, P. Food poisoning analysis of staphylococcal toxin. **Can. J. Microbiol.** **2**: 703 - 714, 1959.
- 103 - TRANTER, H. S. Foodborne Illness: Foodborne staphylococcal illness. **The Lancet** **27**: 1044 - 1046, 1990.
- 104 - TU, K. K. and PALUTKE, W. A. Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus*. **J. Clinical Microbiol.** **3** (1): 77 - 78, 1976.
- 105 - UMOH, V. J.; ADESIYUN, A. A. and GOMWALK, N. E. Enterotoxin production by staphylococcal isolates from nigerian fermented milk products. **J. of Food Protection** **51** (7): 534 - 537, 1988.
- 106 - VARADARAJ, M. C. and RANGANATHAN, B.. Staphylococcal enterotoxins - methods of production and detection - A Review. **Indian J. Dairy Sci.** **42** (2): 267 - 277, 1989.
- 107 - _____ Isolation and characteristics of Staphylococci from foods: a Review. **J. Food Science Technol.** **22**: 378 - 386, 1985.

- 108 - WHITE, D. G.; HARMMMON, R. J.; MATOS, J. E. S. and LANGLOIS, B. E. Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of mulliparous heifers. **J. Dairy Sci.** 72: 1886 - 1892, 1989.
- 109 - WIENEKE, A. A.. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. **J. of Hyg.** 73: 255 - 262, 1974.
- 110 - WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. **Rev. Saúde Públ.** 11: 1 - 11, 1977.

VIII - APÊNDICE

- Meio diferencial e seletivo Baird-Parker (Difco), adicionado de telurito de potássio e gema de ovo.

Componentes por litro:

Triptona	10g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	1g
Glicina	12g
Piruvato de Sódio	10g
Cloreto de Lítio	5g
Ágar	20g

Preparo:

Para 950 mL de água destilada ou deionizada adicionar 63g do meio, aquecer até a fervura para completa dissolução do meio. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

Solução com gema de ovo e telurito de potássio:

Embeber os ovos em cloreto de mercúrio aquoso 1:1000 ou álcool etílico 70% por 1 minuto. Lavar em água estéril e secar com pano estéril.

Quebrar os ovos assepticamente e separar as gemas.

Colocar 50 mL da gema para 10 mL de telurito de potássio 1% esterilizado.

- Meio de enriquecimento: Infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco)

Componentes por litro:

Infusão de cérebro bovino	200g
Infusão de coração bovino	250g
Proteose Peptona	10g
Dextrose	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato dissódico	2,5g

Preparo:

Para rehidratar, dissolver 37g em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

-Base Ágar Sangue (BBL)

Componentes por litro:

Infusão músculo de coração	375g
Triptona Peptona	10g
Cloreto de sódio	5g
Ágar	15g

Preparo:

Suspender 40g do meio em 1000 mL de água destilada. Aquecer até a completa dissolução do meio. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120° C.

Para a detecção de hemólise, adicionar 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

- Ágar Vermelho de Fenol (Difco)

Componentes por litro:

Proteose Peptona nº 3	10g
Extrato de carne	1g
Cloreto de Sódio	5g
Ágar	15g
Vermelho de Fenol	0,025g

Preparo:

Suspender 31g do meio em 1000 mL de água destilada e aquecer até o meio estar completamente dissolvido. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

Solução de Manitol:

Para uma concentração de 1% de manitol no meio vermelho de fenol, foi preparada uma solução com 10% de manitol.

A solução foi esterilizada por filtração em millipore.

- Meio para a produção de enterotoxinas. Triptona (Difco)3% e Extrato de Levedura (Biobrás)1%.

Triptona :

Digestão pancreática de caseína

Extrato de Levedura:

Nitrogênio total	7,4%
Cloretos	3,0%
Resíduos de Ignição	13,0%
Umidade	3,5%
Proteína coagulável	negativo